



**BEATRIZ LOPES DA  
SILVA DIAS MANO**

**RELAÇÃO ESTRUTURA-ECOTOXICIDADE DE  
LÍQUIDOS IÓNICOS: EFEITO DO ANIÃO, DO CATIÃO  
E DA CADEIA ALQUÍLICA DO CATIÃO**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**BEATRIZ LOPES DA  
SILVA DIAS MANO**

**RELAÇÃO ESTRUTURA-ECOTOXICIDADE DE  
LÍQUIDOS IÓNICOS: EFEITO DO ANIÃO, DO CATIÃO  
E DA CADEIA ALQUÍLICA DO CATIÃO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Doutora Joana Luísa Pereira, Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e coorientação da Doutora Maria de Fátima T. Jesus, Investigadora Associada ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Sónia Patrícia Marques Ventura, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Os trabalhos contidos nesta  
Dissertação foram desenvolvidos no  
contexto do projeto ToxMix, financiado  
pela Fundação para a Ciência e  
Tecnologia (ref. PTDC/ATP-  
EAM/5331/2014)

Aos meus pais. Aos que nunca me deixaram desistir. Obrigada.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, não nos vemos se não saímos de nós.”

José Saramago

## **o júri**

presidente

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

Professora Auxiliar com Agregação de Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

**Doutor Sérgio Miguel Reis Luís Marques**

Investigador em Pós Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro

orientadora

**Doutora Joana Luísa Lourenço Estevinho Pereira**

Investigadora em Pós Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Chegou o momento para o qual trabalhei todos estes anos da minha formação académica. Chegou o fim desta etapa, a mais suada, a mais trabalhosa, a mais empolgante, mas também a mais desafiante da minha vida. Resta-me agradecer a todos que fizeram, fazem e farão parte tanto do meu percurso profissional, como. Pessoal.

À minha orientadora, Doutora Joana Pereira, por todo o conhecimento que me transmitiu, por cada ensinamento e confiança que depositou em mim. Obrigada pela disciplina, exigência, companheirismo e acima de tudo pela amizade e por estar sempre disponível. Levarei cada palavra comigo, tanto para a vida profissional, como para a minha vida pessoal.

À minha coorientadora, Doutora Fátima Jesus, a pessoa mais compreensiva, mais profissional e mais querida que ajudou incessantemente neste percurso. Um grande obrigada pela sua disponibilidade e prontidão. Nunca me vou esquecer de tudo o que fez por mim.

Um agradecimento à minha coorientadora Doutora Sónia Ventura e um grande obrigada à Ana Rita Teles por estar sempre disponível e contactável.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Fernando Gonçalves pelo seu apoio, pela sua pronta disponibilidade e presença ao longo deste trabalho.

Aos membros do grupo LEADER, pela amizade, disponibilidade e paciência, mas principalmente por tornarem os dias longos em dias curtos e os dias tristes em dias felizes.

Aos meus pais que sempre estiveram presentes de corpo e alma em cada passo da minha vida. À minha mãe, mulher da minha vida, a minha força, o meu ombro amigo e às palavras de conforto e de ajuda que só ela sabe me dar. Ao meu pai, homem da minha vida, à pessoa mais trabalhadora e inteligente que conheço, obrigada pelo bom ouvinte e conselheiro que és. Obrigada patrocinadores oficiais.

Aos meus avós por todo o carinho e paciência. À minha avó, que sempre me conforta com a comidinha boa e com uma palavra de preocupação. Ao meu avô, poeta da minha vida, obrigada por cada palavra e por cada ensinamento: “Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma” [Lavoisier].

Aos meus amigos, todos sem exceção, vós sois incríveis e a minha vida seria mais cinzenta e sem sentido sem vós. Obrigada por nunca me faltarem nem falharem. Sempre resilientes e juntos até ao fim.

Aos meus padrinhos, sem vós os momentos de lazer não seriam possíveis e trabalhar sem descanso e diversão seria desgastante e muito mais difícil.

A vida é uma aventura, mas não seria alucinante sem estas pessoas ao meu lado. Vós sois as minhas asas.

## palavras-chave

colinas; imidazólios; Microtox; testes de inibição do crescimento; testes de inibição alimentar; ensaio de toxicidade em embriões de peixe; curvas de distribuição de sensibilidade de espécies; *Daphnia magna*; espécies reativas de oxigénio; substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico; biomarcadores enzimáticos; biomarcador de transformação; regras heurísticas.

## resumo

A toxicidade dos Líquidos Iónicos (LIs) para organismos aquáticos tem sido alvo de bastante interesse, dado que, apesar de a estes compostos se ter atribuído, geralmente, um carácter “verde”, algumas evidências do contrário têm sido encontradas. No entanto, a avaliação da toxicidade dos LIs tem-se baseado num reduzido número de espécies, o que é limitativo dada a variação de sensibilidade que diferentes espécies podem exibir a diferentes classes de LIs. Só considerando esta sensibilidade diferencial é possível validar, de uma forma integrada, as regras heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs (efeito do anião, do catião e da extensão da cadeia alquílica do catião). Neste contexto, foram selecionados 4 LIs modelo – 2 baseados no catião colina e 2 baseados no catião imidazólio - e a sua toxicidade para uma grande variedade de espécies foi determinada, o que permitiu o desenvolvimento de curvas de distribuição de sensibilidade de espécies e, conseqüentemente, a determinação de valores de referência que sinalizam as concentrações de LI a que 5% e 50% das espécies das comunidades aquáticas deverão estar afetadas ( $HC_5$  e  $HC_{50}$ ). Esta abordagem integradora permite estabelecer relações mais fidedignas entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade. Observou-se que os valores de  $EC_{50}$  apresentavam uma ampla gama de variação, sendo que a espécie mais sensível a cada LI era variável. A variação da toxicidade, no global, apresenta a seguinte ordem: cloreto de colina ([Chol]Cl)  $\approx$  dihidrogenocitrato de colina ([Chol][DHCit])  $\leq$  cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ([C<sub>2</sub>mim]Cl) < cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio ([C<sub>12</sub>mim]Cl). Assim, foi possível validar as regras heurísticas reconhecidas inicialmente, não deixando de ser preocupante a elevada toxicidade (comparativamente) do [C<sub>12</sub>mim]Cl.

Numa segunda fase do trabalho foi estudada a resposta de *Daphnia magna* ao potencial *stress* oxidativo imposto pela exposição a cada um dos 4 LIs selecionados. Esta resposta foi avaliada através da quantificação substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), que denunciam dano oxidativo membranar, assim como da atividade de enzimas com papel relevante na eliminação das espécies reativas de oxigénio (ROS) - glutathione redutase (GR) e a enzima de biotransformação, glutathione S-transferase (GST). O aumento da atividade da enzima GR verificado após exposição ao [C<sub>12</sub>mim]Cl demonstra o potencial deste LI como indutor de *stress* oxidativo. Estes resultados apenas permitem validar a regra heurística do aumento da cadeia alquílica do catião ao nível sub-celular.

## keywords

cholines; imidazoles; Microtox; growth inhibition tests; food inhibition tests; toxicity test on fish embryos; species sensitivity distribution curves; *Daphnia magna*; Oxygen-reactive species; 2-thiobarbituric acid reactive substances; enzymatic biomarkers; biomarker transformation; heuristic rules.

## abstract

The toxicity of Ionic Liquids (ILs) to aquatic organisms has been receiving considerable interest since, although these compounds have generally been attributed a "green" character, some challenging evidence has been found. However, the evaluation of the toxicity of ILs has been based on a reduced number of species, which is limiting given the sensitivity variation that different species can exhibit to different classes of ILs. Only if appraising this differential sensitivity it is possible to validate, in an integrated way, the heuristic rules that are assumed for the ecotoxicity of ILs (role of the anion, cation and cation alkyl chain extension). In this context, 4 ILs - 2 based on cationic choline and 2 based on the imidazolium cation were selected, and their toxicity towards a great variety of species was determined, which allowed the development of species sensitivity distribution curves and consequently, the estimation of reference values that signal the IL concentrations at which 5% and 50% of the aquatic communities species should be affected (HC<sub>5</sub> and HC<sub>50</sub>). This integrative approach allows establishing more reliable relationships between the structure of ILs and their ecotoxicity. It was observed that EC<sub>50</sub> values presented a wide range of variation, and the species most sensitive to each IL was variable. The overall toxicity order was as follows: choline chloride ([Chol]Cl)  $\approx$  choline dihydrogencitrate ([Chol][DHCit])  $\leq$  1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([C<sub>2</sub>mim]Cl) < 1-dodecyl chloride -3-methylimidazolium ([C<sub>12</sub>mim]Cl). Thus, it was possible to validate the initially recognized heuristic rules, and to recognise that the toxicity [C<sub>12</sub>mim]Cl is comparatively higher, which may pose environmental concern.

In a second stage of the study, the oxidative stress response of *Daphnia magna* to exposure to each of the 4 selected ILs was studied. This response was evaluated through the quantification of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which signal membrane oxidative damage, as well as through the quantification of the activity of enzymes with a relevant role in the elimination of reactive oxygen species (ROS) - glutathione reductase (GR) and the biotransformation enzyme, glutathione S-transferase (GST). The results show an increase in the activity of GR following exposure to [C<sub>12</sub>mim] Cl, suggesting that this IL has a potential as an inducer of oxidative stress. These results validate at the sub-cellular level only the heuristic rule denoting an increase in toxicity with the increase of the cation alkyl chain.



# Índice

<b>Capítulo I. Introdução geral</b>	<b>1</b>
I.1. Líquidos Iônicos: desenvolvimento e aplicações	1
I.2. Características gerais dos LIs	3
I.3. Ecotoxicidade de LIs	5
I.3.1. LIs baseados em imidazólio e colina: características específicas e ecotoxicidade	6
I.3.1.1. Imidazólios	7
I.3.1.2. Colinas	8
I.4. Distribuição de sensibilidade de espécies (SSDs)	10
I.5. Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo e dano membranal	14
I.6. Organização e objetivos da dissertação	18
I.7. Referências bibliográficas	20
 <b>Capítulo II. Avaliação da aplicabilidade de regras heurísticas sobre a ecotoxicidade de líquidos iônicos utilizando distribuição de sensibilidade de espécies</b>	 <b>36</b>
II.1. Introdução	37
II.2. Materiais e Métodos	39
II.2.1. Recolha de valores de EC <sub>50</sub> da literatura	39
II.2.2. Ensaio laboratoriais	40
II.2.2.1. Químicos	40
II.2.2.2. Teste de inibição da bioluminescência (Microtox)	40
II.2.2.3. Teste de inibição do crescimento de microalgas	42
II.2.2.4. Teste de inibição do crescimento de macrófitas aquáticas	44
II.2.2.5. Teste de inibição alimentar pós-exposição em <i>Daphnia magna</i>	46
II.2.2.6. Teste de inibição alimentar em <i>Corbicula fluminea</i>	49
II.2.2.7. Teste de toxicidade em embriões de peixe	51
II.2.3. Análise dos dados	53
II.2.3.1. Cálculo dos valores de EC <sub>50</sub>	53

II.2.3.2. SSDs	55
II.3. Resultados e Discussão	55
II.4. Conclusão	63
II.5. Referências bibliográficas	64
II.6. Anexos	69
Anexo II.6.1. Contagem de microalgas	69
Anexo II.6.2. Cruzamentos de <i>D. rerio</i>	71
Anexo II.6.3. Valores de EC <sub>50</sub>	74
<b>Capítulo III. Potencial de líquidos iônicos para causar <i>stress</i> e dano oxidativo em <i>Daphnia magna</i></b>	<b>76</b>
III.1. Introdução	77
III.2. Materiais e Métodos	79
III.2.1. Compostos químicos	79
III.2.2. Organismo de teste e manutenção da cultura	79
III.2.3. Teste de imobilização	80
III.2.4. Exposição para análise das respostas de <i>stress</i> oxidativo	81
III.2.5. Homogeneização	83
III.2.6. Quantificação da proteína	83
III.2.7. Quantificação de peroxidação lipídica – ensaio de TBARS	84
III.2.8. Biomarcadores enzimáticos	84
III.2.8.1. Quantificação da atividade da enzima GR	84
III.2.8.2. GST	85
III.2.8.3. Análise dos dados	86
III.3. Resultados e Discussão	87
III.4. Conclusão	90
III.5. Referências bibliográficas	92
<b>Capítulo IV. Considerações Finais</b>	<b>96</b>
IV.1. Conclusões finais	96
IV.2. Referências bibliográficas	99

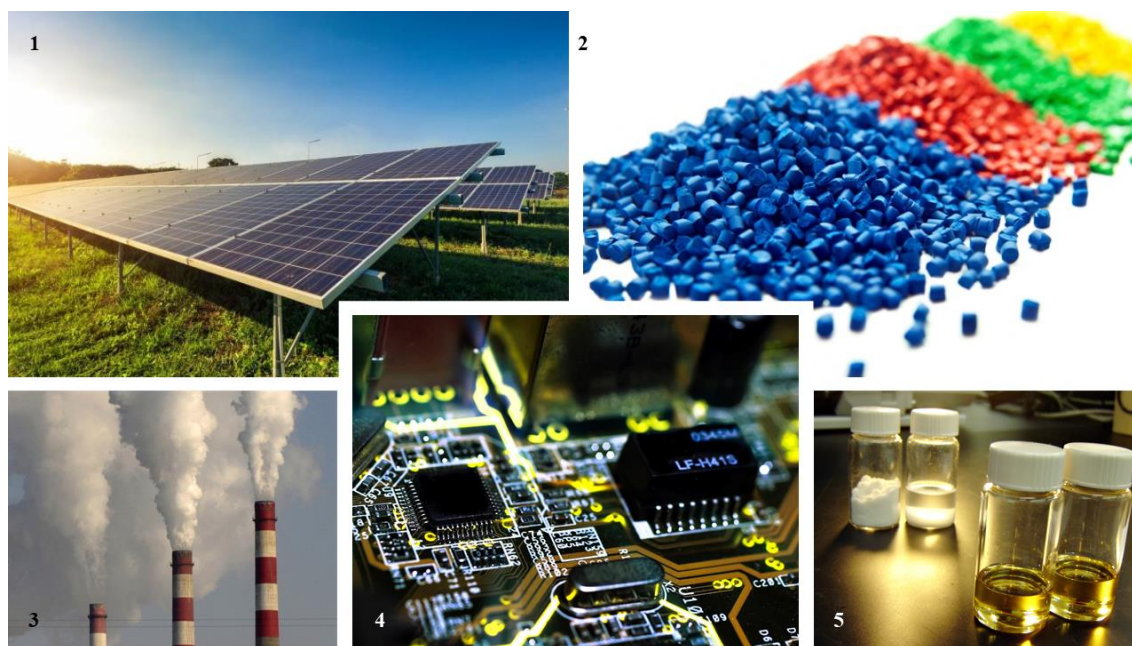
## Capítulo I. Introdução geral

A presente dissertação de Mestrado converge para um paradigma frequente na área da Ecotoxicologia e da proteção ambiental, que é a utilização de organismos-modelo para conhecer potenciais efeitos de diferentes causas de *stress*, que podem ter origem natural e/ou influência das atividades antropogénicas. Os agentes de *stress* abordados neste trabalho, os Líquidos Iónicos (LIs), foram selecionados por possuírem um carácter particular, por serem estudados há relativamente pouco tempo e pelas potenciais oportunidades de aplicação.

### I.1. Líquidos Iónicos: desenvolvimento e aplicações

O termo Líquido Iónico (LI) data do ano 1914 e surgiu com a síntese de nitrato de etilamónio por Paul Walden. Este composto é, provavelmente, o primeiro a ser descrito na literatura e a respeitar a definição de LI considerada atualmente. Embora relatado pela primeira vez em 1914 (Paul Walden 1914), a definição de LI continua em constante atualização. LIs baseados no anião cloroaluminato foram patenteados em 1948 e posteriormente, em 1970, Wilkes desenvolveu LIs para a utilização de eletrólitos de baterias (Wilkes *et al.* 1982). Mais recentemente, em 1990 estes têm sido considerados produtos químicos promissores como solventes (Wilkes 2002). Assim, surge esta nova classe de solventes compostos por aniões de pequenas dimensões e catiões de maiores ou menores dimensões, orgânicos ou inorgânicos. Na generalidade, os LIs apresentam-se em estado líquido a temperaturas inferiores a 100°C; inclusive alguns são líquidos à temperatura ambiente. Os LIs surgem como substitutos mais biocompatíveis para os solventes orgânicos voláteis (Chen *et al.* 2002; Kragl *et al.* 2002; Van Rantwijk *et al.* 2003; Wasserscheid e Welton 2007; Freire *et al.* 2012), o que se apresenta como uma vantagem para a indústria em determinados setores de aplicação. Inicialmente os LIs eram utilizados como surfactantes, sendo os mais comuns os sais quaternários de amónio. Posteriormente, vieram revolucionar o mundo dos solventes orgânicos, pois surgiram como solventes alternativos e mais benignos, tanto na química (controle da distribuição do produto, aumento da taxa e/ou reatividade, facilidade de recuperação do produto, imobilização do catalisador e reciclagem) como na bioquímica (polimerização enzimática em LIs, extração

de proteínas e enzimas para biocatálise e produção de biocombustíveis) (Prado e Weber 2016). A utilização destes novos solventes confere várias vantagens de aplicabilidade, como a maior estabilidade e maior flexibilidade e durabilidade na aplicação. Os LIs têm diversas e distintas aplicações (**Figura 1**): na extração de metais (*e.g.* extração de mercúrio); como eletrólitos de baterias (*e.g.* otimização da condutividade de baterias de lítio, onde o LI é utilizado como eletrólito); aplicações biológicas (*e.g.* agente ativador de enzimas); uso em biomassa (*e.g.* conversão de biomassa em biocombustíveis economicamente viáveis) (Prado e Weber 2016); polímeros (polímeros condutores intrínsecos); sorção de CO<sub>2</sub> (produção de energia elétrica, mitigação do CO<sub>2</sub> na atmosfera, indústria de gás natural, produção de H<sub>2</sub>); nanodepósitos poliméricos (células solares, materiais foto-resistentes utilizados na microeletrônica e tecnologias de microssistemas, em sensores, eletrólitos, etc.) (Tang *et al.* 2005).



**Figura 1** - As diversas aplicações dos LIs: 1) Nanodepósitos poliméricos - painéis solares (Fonte: Expresso); 2) Polímeros (Fonte: Industrial); 3) Mitigação de emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera (Fonte: Ricardo Garcia); 4) Microeletrônica (Fonte: Premium, Sihirbaz Hilelerini Hacamat Eden Telefon: Xperia XZ); 5) Solventes (Fonte: Santos 2011).

## I.2. Características gerais dos LIs

Os LIs são compostos constituídos por um catião orgânico com elevado peso molecular e por um anião orgânico ou inorgânico (Freire *et al.* 2012). A assimetria da estrutura iónica e a dispersão das cargas são responsáveis por atrações intermoleculares mais baixas, razão pela qual os pontos de fusão são baixos, a pressão de vapor é mínima e a dispersão das cargas é responsável pela menor atração intermolecular (Ranke *et al.* 2004; Ventura *et al.* 2014). Por este motivo, a generalidade dos LIs são sais líquidos à temperatura ambiente e em geral permanecem no estado líquido a temperaturas inferiores ao ponto de ebulição da água (Wilkes 2002). Além destas propriedades, os LIs são conhecidos pela sua não-inflamabilidade e não explosividade (Deetlefs *et al.* 2006; Earle *et al.* 2006; Lovelock *et al.* 2010). Estes possuem também uma série de propriedades incomuns, nomeadamente uma elevada estabilidade química e térmica, elevada condutividade iónica e uma gama eletroquímica muito versátil e útil para múltiplos fins industriais (*e.g.*, aplicados à engenharia dos materiais, pois a condutividade é uma característica importante dos materiais) e aplicados como solventes (Wasserscheid e Keim 2000; Haerens *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2011).

Considerando a baixa ou mesmo nula pressão de vapor, os LIs não se apresentam como poluentes na atmosfera (Anthony *et al.* 2001; Freire *et al.* 2007b). No entanto, o seu carácter iónico faz com que a maioria deles sejam solúveis em água, o que se apresenta como um problema se estes forem tóxicos para os organismos aquáticos (Marsh *et al.* 2004; Keskin *et al.* 2007). As suas propriedades, como a resistência à fotodegradação (Stepnowski e Zaleska 2005), o potencial de bioacumulação (Ventura *et al.* 2011) e a elevada solubilidade (Freire *et al.* 2007a, b, 2008a, b, 2009, 2010) sugerem que estes compostos podem representar uma ameaça para os organismos aquáticos, se se encontrarem em concentrações relevantes após descarga no ambiente.

Os LIs são considerados uma versão melhorada dos solventes orgânicos tradicionais essencialmente devido ao seu *design* característico, nomeadamente a possibilidade de ajustar a sua hidrofobicidade<sup>1</sup>/hidrofilicidade<sup>2</sup> modificando o catião ou o anião: é possível adicionar cadeias alquílicas, grupos funcionais (*e.g.*, ciano, éter, hidroxilo, entre outros), e/ou anéis aromáticos para obter um conjunto de propriedades

---

<sup>1</sup> Característica principal das moléculas que apresentam repulsão pela água.

<sup>2</sup> Característica inerente das moléculas que têm afinidade com a água.

específicas (van Rantwijk e Sheldon 2007). Isso resulta na possibilidade de ajustar um LI a uma aplicação específica, e por isso os LIs são muitas vezes designados por *designer solvents*. Dada a relevância de segurança ambiental na regulação do mercado, é útil e pertinente equacionar o desenvolvimento de LIs ajustados, tanto do ponto de vista técnico como ambiental, minimizando o conjunto de LIs submetidos à avaliação obrigatória de risco prospetivo, por exemplo no contexto europeu (Diretiva REACH; EC 1907/2006) antes do licenciamento do novo solvente ou do novo processo. Este passo prévio de otimização potencia a diminuição de custos inerentes ao desenvolvimento de LIs que possam ser desadequados sob o ponto de vista ambiental ou que possam ser substituídos (sem perda de eficiência na aplicação) por LIs alternativos que representem menor perigosidade ambiental (Santos *et al.* 2015).

De facto, nos últimos anos, a atenção para o conhecimento dos efeitos ambientais de vários compostos químicos foi estimulada por padrões regulatórios, nomeadamente os estabelecidos pelo regulamento da União Europeia para Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas (REACH, *e.g.* EC 1907/2006). Neste contexto, o termo ‘Química Verde’ adquiriu uma relevância crescente, sendo o seu princípio de base a redução da toxicidade ambiental de compostos químicos utilizados em processos industriais ou na formulação de novos produtos (Wilkes 2002). Na Europa, a Diretiva REACH (*e.g.* EC 1907/2006) exige o registo de novos produtos químicos comerciais e responsabiliza os fornecedores pelos seus produtos. Portanto, a otimização do desempenho técnico deve ser executada em paralelo com a minimização do potencial de risco, visando reduzir o seu impacto ambiental e assim melhorar por defeito a viabilidade económica (Docherty e Kulpa, Jr. 2005). Atualmente, os processos de avaliação de risco ambiental de novos compostos químicos já ultrapassaram o paradigma que se baseava essencialmente na determinação e previsão dos níveis de contaminantes nos vários compartimentos ambientais, bem como na comparação dessas concentrações com valores limiares legislativos ou padrões de segurança ambiental estabelecidos, o que exhibe baixo nível de integração com informação relativa aos efeitos correspondentes nos ecossistemas (Jager *et al.* 2001; Oost *et al.* 2003). Há uma consciencialização crescente de que o foco apenas em dados químicos é insuficiente para avaliar com segurança os potenciais riscos da entrada de contaminantes exógenos nos ecossistemas, essencialmente porque a relação entre a(s) causa(s) e o efeito na biota não é linear (de Maagd 2000; Heugens *et al.* 2001). Neste

contexto, a avaliação ecotoxicológica abrangente de novos químicos é essencial para caracterizar os riscos ambientais que eles podem representar, para apoiar a definição de níveis de segurança ambiental que deverão ser cumpridos se forem libertados para diferentes compartimentos ambientais e, no global, para apoiar a definição do seu nível de sustentabilidade ambiental (Duke e Taggart 2000).

### **I.3. Ecotoxicidade de LIs**

Os LIs são definidos como "solventes verdes" e esta definição baseia-se em quatro argumentos focados na comparação com solventes orgânicos tradicionais: síntese menos perigosa (Deetlefs e Seddon 2010); pressão de vapor nula (Deetlefs *et al.* 2006; Earle *et al.* 2006); biocompatibilidade; e, finalmente, a sua potencialmente menor ecotoxicidade (Ranke *et al.* 2007; Pretti *et al.* 2009). É no contexto deste último argumento que se enquadra a presente Dissertação.

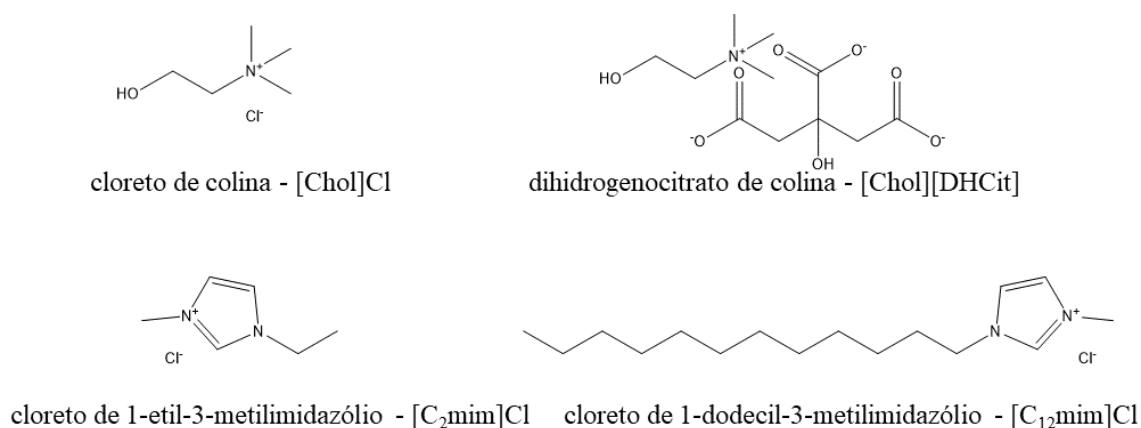
O número de estudos de avaliação ecotoxicológica, bem como a mobilidade ambiental dos LIs e a potencial contaminação em diferentes matrizes ambientais está em crescimento (Ranke *et al.* 2007; Coleman e Gathergood 2010; Frade e Afonso 2010). Trabalhos anteriores sugerem que a ecotoxicidade dos LIs varia com os organismos testados (Stolte *et al.* 2007; Pretti *et al.* 2009; Ventura *et al.* 2010; Matzke *et al.* 2010; Santos *et al.* 2015) e, no que diz respeito à toxicidade aquática (Beadham *et al.* 2012), ainda existe uma grande incerteza quanto aos efeitos e mecanismos de toxicidade de novas famílias em diferentes espécies. As espécies mais testadas abrangem níveis tróficos funcionalmente relevantes nos ecossistemas de água doce: os produtores, representados por microalgas (*e.g.* Cho *et al.* 2008; Kulacki e Lamberti 2008); os consumidores primários, representados por cladóceros (*e.g.* Wells e Coombe 2006; Luo *et al.* 2008; Pretti *et al.* 2009; Ventura *et al.* 2010); e os decompositores, representados por bactérias (Ranke *et al.* 2004; Samorì *et al.* 2007; Stolte *et al.* 2007; Ventura *et al.* 2010).

Os efeitos tóxicos dos LIs têm sido abordados em vários estudos, o que permitiu estabelecer algumas tendências que governam a sua ecotoxicidade. Por exemplo, os LIs com uma cadeia alquílica longa substituída no catião ou anião tendem a ser mais ecotóxicos (Ventura *et al.* 2010, 2012a, b) até um certo limite em termos de comprimento da cadeia, onde, independentemente do número de carbonos adicionados, deixa de existir

incremento adicional na toxicidade do LI ('efeito de corte'; *e.g.* Ventura *et al.* 2010). Relativamente ao catião, tido como o principal responsável pela toxicidade, sabe-se que a sua funcionalização altera a sua toxicidade. De facto, os catiões funcionalizados possuem um grupo funcional característico, tendendo a produzir LIs menos tóxicos quando comparados com os homólogos que não têm grupos funcionais específicos, pois tornam-se mais hidrofílicos. O anião também tem capacidade para modificar a toxicidade dos LIs embora, na maior parte dos casos, a dimensão dessas alterações seja inferior à que se verifica no caso de alteração do catião (Couling *et al.* 2006; Stolte *et al.* 2007; Arning *et al.* 2008; Thuy Pham *et al.* 2010; Santos *et al.* 2015).

### I.3.1. LIs baseados em imidazólio e colina: características específicas e ecotoxicidade

O desenvolvimento de novas estruturas e aplicações dos LIs tem estado em expansão nas últimas décadas, sendo os LIs à base de imidazólio uma das classes mais estudadas. Outro tipo de LIs muito estudados e utilizados são os derivados de fontes naturais como aminoácidos, hidratos de carbono ou colinas (Freire *et al.* 2007b). Neste trabalho, foram focadas duas classes de LIs, tendo sido avaliada a toxicidade de quatro solventes para diversos organismos aquáticos: dois LIs à base de imidazólio ([C<sub>2</sub>mim]Cl e [C<sub>12</sub>mim]Cl) e outros dois LIs à base de colina ([Chol]Cl e [Chol][DHCit]), os quais se apresentam representados na **Figura 2**.



**Figura 2** - Estrutura química dos LIs utilizados no presente trabalho e respetivas fórmulas abreviadas. Fonte: *ChemDraw Professional 16 Individual ASL SN Win*.



### I.3.1.1. Imidazólios

Os LIs à base de imidazólio foram os primeiros a serem desenvolvidos e estudados. Estes apresentam elevada importância biológica e uma infinidade de aplicações em diferentes áreas (Zdanowicz *et al.* 2016), nomeadamente na purificação de proteínas, (*e.g.* Wang *et al.* 2005; Ruiz-Angel *et al.* 2007); na indústria farmacêutica, na formulação de fungicidas, anti-protozoários, anti-hipertensivos e em fármacos contra o cancro, como a mercaptopurina, que interfere com o genoma (*e.g.* Kaliszan *et al.* 2004; Malhotra e Kumar 2010; Viau *et al.* 2010; Smiglak *et al.* 2014); na natureza, estão presentes nas folhas de chá e em feijões na forma de teofilina que é um estimulante do sistema nervoso central (*e.g.* Wei *et al.* 2013); são também utilizados como inibidores de processos corrosivos promovidos por metais de transição, como o cobre ( $\text{Cu}^+$ ) (Wasserscheid e Keim 2000; Migowski e Dupont 2007).

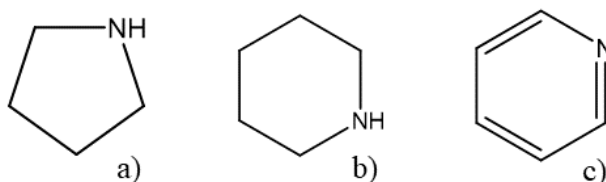
Os LIs à base de imidazólio são ecotóxicos e apresentam uma biodegradabilidade<sup>3</sup> limitada (Coleman e Gathergood 2010; Thuy Pham *et al.* 2010). O teste de *Sturm* modificado (ISO9439:1999) foi utilizado para avaliar a biodegradabilidade de LIs baseados em imidazólios que possuem cadeias laterais ligadas a grupos éster. Utilizando dois métodos de teste complementares para investigar a biodegradabilidade dos LIs, Gathergood e colaboradores (Coleman e Gathergood 2010) concluíram que os sais de halogéneos de imidazólio contendo porções de ésteres mostraram uma biodegradação melhorada.

Relativamente aos padrões de toxicidade dos LIs baseados em imidazólio, os valores de  $\text{EC}_{50}$  (Concentração conducente a 50% de Efeito inibitório) obtidos mostram que os LIs baseados nos catiões imidazólio e piridínios (aromáticos) são em geral mais tóxicos do que os baseados em catiões não aromáticos (Freire *et al.* 2010; Ventura *et al.* 2013). Quanto à variação do anião, reconhece-se que este tem efeitos menos relevantes sobre a toxicidade de vários LIs baseados em imidazólio (Ranke *et al.* 2004; Couling *et al.* 2006; Ventura *et al.* 2013), embora o aumento da série de estudos considerando novas sínteses destes LIs tenha revelado que o anião influencia a toxicidade (Jastorff *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2013). Os LIs não aromáticos, nomeadamente o pirrolidínio (*i.e.*, amina cíclica com um anel formado por quatro átomos de carbono e um átomo de azoto;

---

<sup>3</sup> característica de algumas substâncias químicas que indica que podem ser usadas como substratos por microrganismos e, portanto, transformadas ou degradadas.

**Figura 3 a))** e o piperidínio (*i.e.*, amina heterocíclica com um anel formado por cinco átomos de carbono e um átomo de azoto; **Figura 3 b))**, apresentam solubilidade e toxicidade em água muito menor do que os LIs aromáticos baseados em imidazólio e piridínio (Garcia *et al.* 2005; Matzke *et al.* 2007; Stolte *et al.* 2007; Romero *et al.* 2008; Ventura *et al.* 2013), cuja estrutura básica se encontra apresentada na **Figura 3 c)**.



**Figura 3** – **a)** pirrolidina (pirrolidínio); **b)** piperidina (piperidínio); **c)** piridina (piridínio) Fonte: ChemDraw Professional 16 Individual ASL SN Win.

### I.3.1.2. Colinas

A colina é um nutriente essencial constituído por um catião N,N,N-trimetil-etanolamónio (Zeisel e Da Costa 2009) que está a receber uma atenção considerável na investigação em LIs (Gorke *et al.* 2010; Domínguez de María e Maugeri 2011) devido ao seu carácter considerado mais “benigno” (Petkovic *et al.* 2011), à sua biocompatibilidade, que se traduzirá num menor potencial de risco ambiental por parte dos LIs à base de colina (Petkovic *et al.* 2010; Sekar *et al.* 2012) e que assim são frequentemente assumidos como “biocompatíveis” ou “benignos” ou mesmo “não tóxicos” (Nockemann *et al.* 2007; Gorke *et al.* 2010; Petkovic *et al.* 2010; Li *et al.* 2012). As colinas derivam de sais de amónio quaternários, descritos como estruturas importantes em processos vivos, utilizados como precursores para a síntese de vitaminas (*e.g.*, complexos de vitamina B e tiamina) e enzimas que participam no metabolismo dos hidratos de carbono (Meck e Williams 1999). Os sais de colina com baixos pontos de fusão têm sido objeto de alguns estudos (Pernak e Chwała 2003; Hamzé *et al.* 2005) e é neste contexto que surge o conceito de LIs baseados em colina. A “biocompatibilidade” da molécula de colina contribuiu para a constituição de um bloco de construção sustentável de LIs de toxicidade previsivelmente baixa. Os LIs baseados em colina são potencialmente biodegradáveis ao contrário do que acontece com outras famílias (Morrissey *et al.* 2009). O desenvolvimento de LIs com base neste catião de

colina tem sido crescente, o que, com os benefícios ambientais associados, conduziu, naturalmente, ao aumento do interesse por estes compostos.

Em termos de potenciais aplicações, os LIs baseadas em colina foram utilizados não apenas como catalisadores ou solventes na síntese orgânica (Morales *et al.* 2003; Abelló *et al.* 2004; Abbott *et al.* 2005, 2006), mas também em processos de separação e purificação em sistemas bifásicos aquosos (ABSs) (Freire *et al.* 2012). Mais recentemente, alguns LIs baseados em colina foram testados na captura de dióxido de carbono (Leron e Li 2013) e, finalmente, na separação de biomoléculas (Gorke *et al.* 2010; Domínguez de María e Maugeri 2011; Pereira *et al.* 2013; Shahriari *et al.* 2013). O interesse no desenvolvimento de sais de colina e da sua aplicação industrial acrescenta significado ao estudo das propriedades ecotoxicológicas dos LIs com base em colina (Santos *et al.* 2015).

Apesar da crescente utilização da família das colinas em diferentes setores de aplicação, o seu comportamento ecotoxicológico ainda é pouco conhecido (Santos *et al.* 2015). Encontram-se vários trabalhos que reportam a sua citotoxicidade, usando linhas celulares de mamíferos (Vijayaraghavan *et al.* 2010; Weaver *et al.* 2010; Frade e Afonso 2010; Suresh *et al.* 2012). Existem também estudos que relatam os efeitos ambientais dos LIs baseados em colina visando especificamente organismos aquáticos (Ventura *et al.* 2013; Santos *et al.* 2015). Estes LIs apresentam uma toxicidade muito baixa para a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, o que corrobora o seu carácter “benigno” (Ventura *et al.* 2014). No entanto, a sua toxicidade para outros organismos aquáticos pode ser superior à de alguns solventes orgânicos comuns (Santos *et al.* 2015).

As tendências gerais que têm sido documentadas relativamente à ecotoxicidade dos LIs, incluindo os baseados em imidazólio e colina (efeito do alongamento da cadeia alquílica, efeito do catião e efeito do anião), são facilitadores da análise de risco dos LIs para efeitos regulamentares, já que poderão permitir a utilização de relações de estrutura-toxicidade na previsão de efeitos tóxicos, sendo essa uma das abordagens permitidas, por exemplo, na aplicação da Diretiva REACH (vide *read-across* como metodologia de suporte à análise de risco de novos químicos em ECHA 2009). De facto, existe um interesse crescente pela aplicação de modelos matemáticos relacionando a variação de elementos estruturais chave dos LIs com a sua (re)atividade biológica (Torrecilla *et al.* 2009; Alvarez-Guerra e Irabien 2011; Yan *et al.* 2012). No entanto, o sucesso desta abordagem tem sido questionado por estudos que observam solventes com efeitos

diferenciados dos esperados pelas relações quantitativas, por exemplo, entre lipofilicidade<sup>4</sup> e ecotoxicidade (Stolte *et al.* 2007), assim como inconsistências nas tendências verificadas para diferentes organismos testados (Santos *et al.* 2015). Assim, o nível de incerteza das relações estrutura-ecotoxicidade que se possam estabelecer com base num determinado organismo indicador, ainda que este possa ter elevada sensibilidade à exposição a LIs, será sempre elevado. Este problema pode ser ultrapassado integrando as respostas ecotoxicológicas de vários organismos após exposição a LIs que representem extremos nas tendências de toxicidade. Esta lógica motivou os trabalhos desenvolvidos no contexto da presente Dissertação no geral, e em particular a utilização das curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (*Species Sensitivity Distribution*, SSD).

#### **I.4. Distribuição de sensibilidade de espécies (SSDs)**

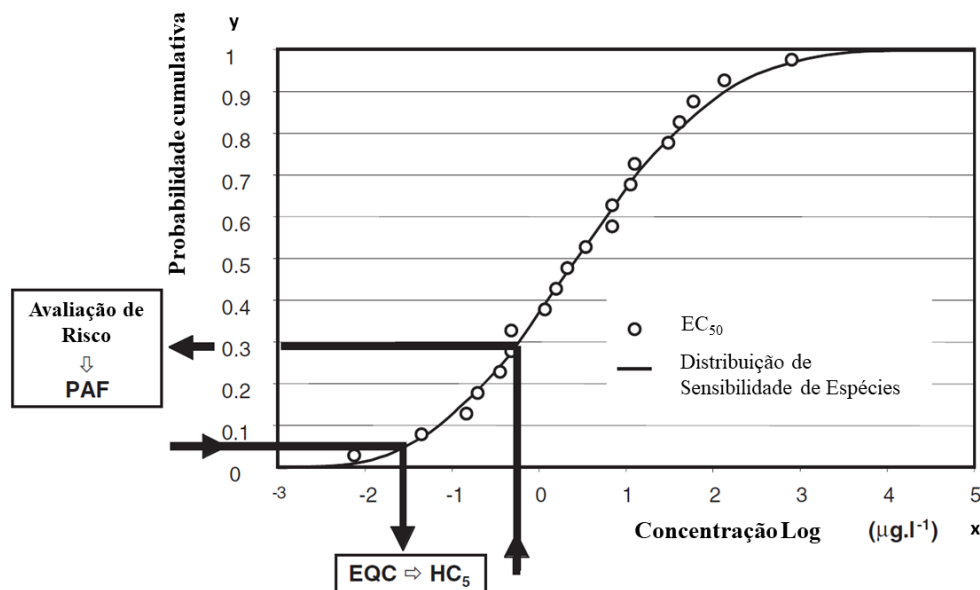
As SSDs foram originalmente propostas por diferentes ecólogos e ecotoxicólogos no final da década de 1970 (Klapow e Lewis 1979; Blanck *et al.* 1984). Os organismos vivos são muito diversos em diversas perspetivas, por exemplo. considerando a sua taxonomia, história de vida, fisiologia, morfologia, comportamento e distribuição geográfica, no contexto da ecotoxicologia, estas diferenças biológicas significam que diferentes espécies podem responder de forma diferente a um composto para uma dada concentração, isto é, diferentes espécies têm diferentes sensibilidades (Brix *et al.* 2001). Desde meados da década de 80 tem-se reconhecido a importância da variação na sensibilidade entre as espécies em ensaios de toxicidade e, conseqüentemente, na variação dos valores que se utilizam para calcular uma concentração que seja segura para a biota (*e.g. Environmental Quality Criteria*; EQC) (Hopkin 1993; Forbes e Forbes 1993; Smith e Cairns 1993; Chapman *et al.* 1998). O reconhecimento de que as sensibilidades aos compostos tóxicos diferem de espécie para espécie e a possibilidade de descrição dessa variação com uma função de distribuição estatística conduziu ao estabelecimento das SSDs (Gingerich 2000). Uma SSD é uma distribuição estatística que descreve a variação de um conjunto de espécies (amostra de comunidade natural) na resposta à exposição a um determinado composto ou mistura de compostos/matriz natural (Posthuma *et al.* 2002).

---

<sup>4</sup> lipofilicidade designa a maior afinidade de um determinado composto para com sistemas mais orgânicos, mais apolares.

De uma forma simples, os dados ecotoxicológicos disponíveis, gerados com diferentes espécies, constituem uma amostra da distribuição natural de sensibilidade das espécies e são usados para ajustar uma regressão não linear (SSD propriamente dita) e estimar parâmetros integradores que refletem a resposta das comunidades visadas com os dados usados.

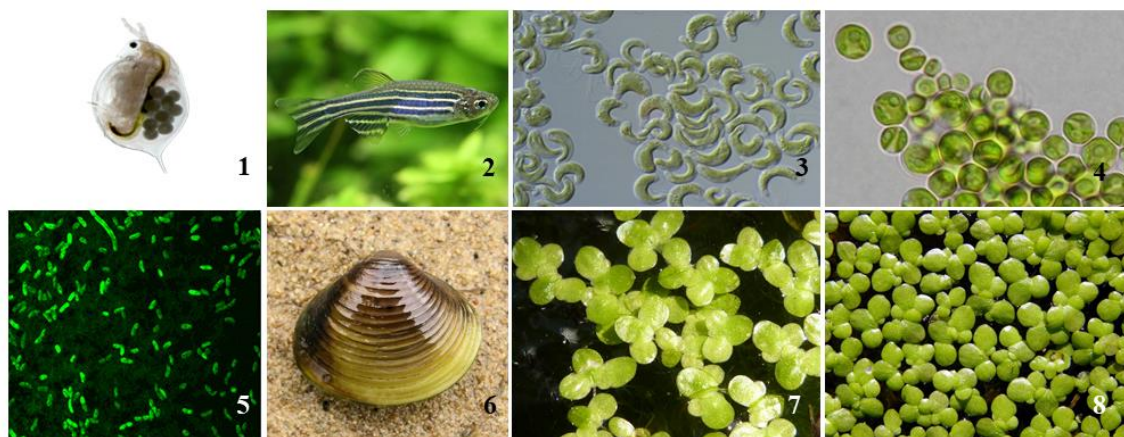
Na **Figura 4** apresenta-se um esquema genérico que descreve uma SSD, ou seja, uma função de distribuição cumulativa ajustada a um conjunto de pontos disponíveis como dados de entrada, que geralmente são valores de  $EC_x$  – do inglês *Effective Concentration*, definido como a concentração estimada que provocará x% de efeito. Uma das mais importantes aplicações das SSD decorre da sua integração como ferramentas da linha de evidência ecotoxicológica da análise de risco ambiental (Brix *et al.* 2001). São, por exemplo, recomendadas no contexto da avaliação ecotoxicológica de pesticidas ao nível europeu (*European Food Safety Authority* (EFSA) 2013) que é determinada pelo Regulamento (EC) nº 1107/2009 (Parlamento Europeu e do Conselho 2009), com implicações para a autorização da comercialização e aplicação destes agroquímicos. Neste contexto, o  $HC_5$  é normalmente considerado para definir níveis seguros dos contaminantes no ambiente (Posthuma *et al.* 2002). O  $HC_5$  corresponde à concentração a que 5% das espécies representativas da comunidade visada (*e.g.* comunidades aquáticas) são afetadas ao nível definido pelos dados de entrada (se estes forem valores de  $EC_{50}$ , então as espécies são afetadas negativamente em 50% do parâmetro ecotoxicológico considerado para construir a SSD).



**Figura 4** - Aparência genérica de uma SSD. A previsão do valor de Y (probabilidade cumulativa) a partir do valor de X (e.g. concentração de um determinado químico) representa a PAF (fração potencialmente afetada de comunidades naturais refletidas na SSD). A previsão do valor de X a partir da assunção que um determinado valor de Y é protetor, representa um EQC (critério de qualidade ambiental), neste caso o HC<sub>5</sub>, i.e., a concentração perigosa para apenas 5% das espécies (Adaptado de van Straalen e Denneman 1989).

No presente trabalho de Dissertação, as SSD foram utilizadas como ferramenta integradora para a confirmação das tendências de ecotoxicidade face a variações de estrutura que se verificam em LIs. Foram selecionadas oito espécies diferentes que representam o compartimento aquático (**Figura 5**): duas microalgas verdes - *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*; duas espécies de macrófitas - *Lemna minor* e *Lemna gibba*, uma espécie de cladóceros - *Daphnia magna*; uma espécie de peixe - *Danio rerio*; uma espécie de bivalve - *Corbicula fluminea*; e uma espécie de bactéria - *Aliivibrio fischeri*. Este conjunto de espécies reflete a intenção de abranger diversos níveis funcionais e posições na teia trófica aquática, representando de uma forma abrangente as comunidades potencialmente afetadas. A relevância do estudo de organismos com diferentes posições na teia trófica está relacionada com a análise de potenciais desequilíbrios nas relações tróficas (transferências de massa e energia) nos ecossistemas, o

que estende o significado das respostas de cada organismo testado à regulação funcional do ecossistema aquático (Knoben *et al.* 1998; Van der Hoeven 2001).



**Figura 5** - Conjunto de espécies selecionadas para o presente trabalho. 1) *Daphnia magna* (Fonte: Herawati *et al.* 2017); 2) peixe-zebra, *Danio rerio* (Fonte: Howe *et al.* 2013); 3) *Raphidocelis subcapitata* (Fonte: Banco de Dados de Recursos de Algas); 4) *Chlorella vulgaris* (Fonte: Algae Research Supply: Algae Culture *Chlorella vulgaris*); 5) *Corbicula fluminea* (Fonte: Santana *et al.* 2013); 6) *Aliivibrio fischeri* (Fonte: Norsworthy e Visick 2013); 7) *Lemna minor* (Fonte: Zhang *et al.* 2010); 8) *Lemna gibba* (Fonte: Verma e Suthar 2015).

Os procedimentos de teste para estas espécies estão amplamente desenvolvidos, documentados e disponíveis (*e.g.* OECD 2006, 2013, 2015), sendo fáceis de implementar. Adicionalmente, os organismos selecionados exibem uma sensibilidade alta a diferentes contaminantes e a sua manutenção e/ou manuseamento em laboratório é simples, o que contribui para a sua frequente utilização.

Para além do interesse académico, há uma tendência crescente para utilizar o comportamento de poluentes (biodisponibilidade<sup>5</sup>, bioacumulação<sup>6</sup> e biotransformação<sup>7</sup>), bem como os efeitos biológicos e bioquímicos induzidos pela exposição a novos químicos em organismos aquáticos para avaliar com maior robustez o seu potencial impacto nos ecossistemas aquáticos (Oost *et al.* 2003). No caso dos LIs, este tipo de avaliação está ainda num nível bastante inicial, que passa essencialmente pela análise do modo como

<sup>5</sup> fração de um determinado contaminante que está disponível para internalização pelo organismo.

<sup>6</sup> processo que ocorre quando compostos químicos/tóxicos se acumulam nos tecidos e/ou estruturas biológicas, sendo desta forma transferíveis para níveis tróficos superiores.

<sup>7</sup> processo em que substâncias xenobióticas sofrem reações (bio)químicas, geralmente mediadas por enzimas, que as convertem em compostos diferentes (*e.g.* um composto solúvel não polar convertido em H<sub>2</sub>O).

estes compostos exercem a sua toxicidade. Neste contexto, argumenta-se que o mecanismo de ação tóxica assenta em processos generalistas de narcose (Santos *et al.* 2015) e que o mecanismo primário conducente a efeitos tóxicos é a ligação e a disrupção da integridade das membranas biológicas (Petkovic *et al.* 2011; Cvjetko Bubalo *et al.* 2014a, b). Apesar destas considerações, não há estudos que demonstrem disrupção membranar *in vivo*, o que motivou o desenvolvimento de trabalho utilizando biomarcadores de *stress* oxidativo e dano membranar no contexto da presente Dissertação.

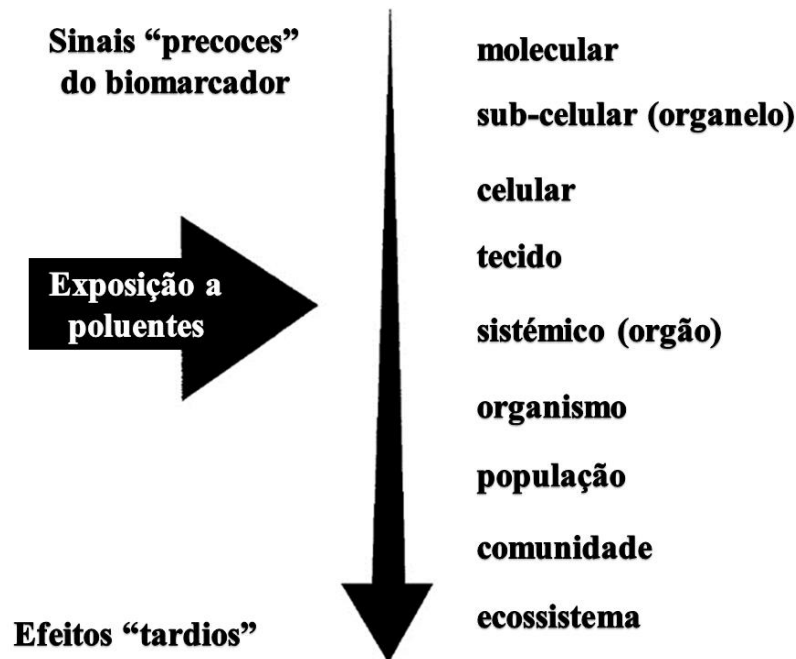
### **I.5. Biomarcadores de *stress* oxidativo e dano membranar**

O termo "biomarcador" é geralmente usado num sentido amplo, incluindo quase todas as medições que refletem uma interação entre um sistema biológico e um cenário de exposição a condições diferentes das ótimas. Um biomarcador é definido como uma mudança numa resposta biológica (molecular, celular, fisiológica e/ou comportamental) que pode estar relacionada com a exposição ou com efeitos tóxicos de contaminantes ambientais (Peakall e Walker 1994). Van Gestel e Van Brummelen (1996) redefiniram os termos “biomarcador”, “bioindicador” e “indicador ecológico”, ligando-os a diferentes níveis de organização biológica. Estes e outros autores consideraram biomarcador como qualquer resposta biológica a um contaminante ambiental ao nível sub-individual, medido dentro de um organismo ou nos próprios produtos (urina, fezes, cabelos, penas, etc.) (Van Gestel e Van Brummelen 1996; Oost *et al.* 2003). Os biomarcadores de exposição e efeito (note-se que os biomarcadores, são habitualmente agrupados em biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade (World Health Organization 1993; Oost *et al.* 2003)) são medições em fluídos corporais, células ou tecidos, que indicam modificações bioquímicas ou celulares devidas à presença e grandeza da exposição a substâncias tóxicas. Assim, contribuem decisivamente para o estabelecimento de relações dose-resposta.

Num contexto ambiental, os biomarcadores são indicadores sensíveis que demonstram que os agentes tóxicos entrados nos organismos foram distribuídos entre os tecidos e estão a provocar um efeito tóxico em alvos críticos (McCarthy e Shugart 1990). Este contexto aplica-se ao problema da definição do mecanismo de toxicidade dos LIs, se forem utilizados biomarcadores para analisar os efeitos de exposições laboratoriais controladas. Paralelamente, quando utilizados em testes de toxicidade, os biomarcadores



podem explicar a base sub-celular ou celular dos efeitos da exposição sobre parâmetros ao nível individual como a sobrevivência e a reprodução, e quando discutidos de forma mais integrada, podem até contribuir para uma compreensão mais alargada de efeitos ao nível supra-individual (Depledge e Fossi 1994) (**Figura 6**).



**Figura 6** - Representação esquemática da ordem sequencial de respostas ao *stress* induzido por um poluente dentro de um sistema biológico (Adaptado de Oost *et al.* 2003).

A nível bioquímico, um dos grupos de biomarcadores mais estudados é o dos biomarcadores de *stress* oxidativo. Estes são biomarcadores de carácter generalista, que respondem a diversos tipos de agentes de *stress*, porque respondem à produção aumentada de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS, da designação em inglês *Reactive Oxygen Species*) (Yu *et al.* 2009). Os químicos que compreendem estados alternados cíclicos de redox, quer orgânicos (*e.g.* quinonas hidrocarbonadas, nitro-aromáticos, fenilbenzeno; Livingstone 1991), quer inorgânicos (*e.g.* metais; Stohs e Bagchi 1995), são particularmente passíveis de induzir a produção de ROS e conduzir a uma condição de *stress* oxidativo. As ROS incluem superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo altamente reativo ( $OH^{\cdot}$ ) (Barata *et al.* 2005). Os organismos podem responder ao aumento da produção de ROS, regulando a defesa antioxidante. Parte relevante da defesa antioxidante celular é constituída por um conjunto de enzimas

antioxidantes, incluindo a glutathione redutase (GR) e outras (*e.g.* glutathione S-transferase, catalase e superóxido dismutase). Neste trabalho em específico vamos trabalhar com a GR, cuja atividade responde à presença de ROS, conforme esquematizado na **Figura 7** (Livingstone 2003). A falha das defesas antioxidantes na desintoxicação da célula relativamente à produção excessiva de ROS pode levar a danos oxidativos significativos, incluindo inativação enzimática, degradação de proteínas, dano no DNA e peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge 2015). Em particular, a peroxidação lipídica é considerada um dos principais mecanismos pelos quais os oxirradicais podem causar danos nos tecidos, dado que induz alterações nas propriedades físico-químicas das membranas celulares, assim comprometendo a função celular no global (Rikans e Hornbrook 1997). A GR constitui o principal sistema defensivo da célula contra as ROS (Guasch *et al.* 2017) (**Figura 6**). A GR reduz a glutathione dissulfeto (GSSG) em duas moléculas de GSH.

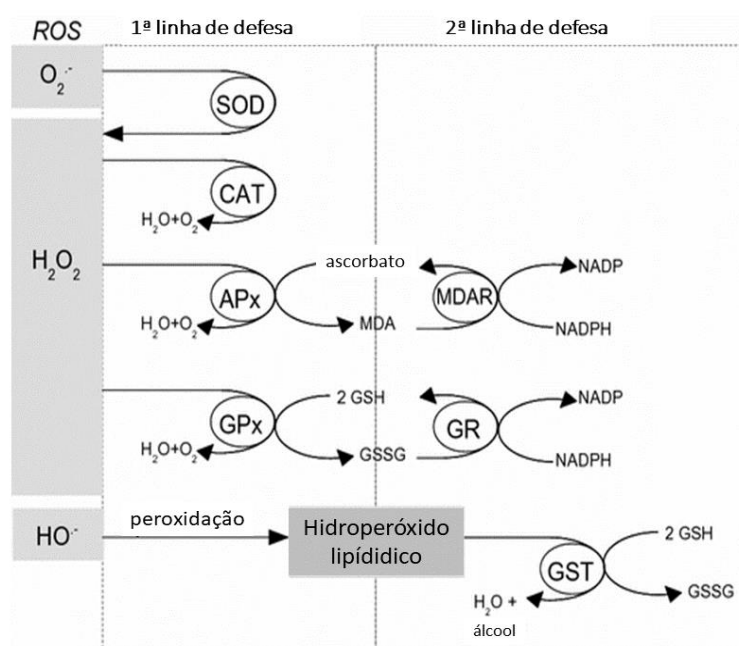
A GST é uma enzima de biotransformação da fase II do metabolismo de destoxificação de xenobióticos, ao contrário das enzimas descritas acima que são enzimas de *stress* oxidativo. No entanto, trata-se de uma isoenzima relevante no contexto da gestão do *stress* oxidativo, já que tem a capacidade de catalisar a conjugação da forma reduzida de glutathione (GSH, um dos principais antioxidantes não enzimáticos que constitui a primeira linha de defesa contra as ROS), para ativar metabolicamente substratos xenobióticos<sup>8</sup>; desta forma, apoia a mitigação da toxicidade destes xenobióticos através da catálise do ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinylglycine) (Blanchette *et al.* 2007), dando-se a biotransformação destes substratos. É através deste processo que os organismos conseguem eliminar tóxicos ambientais de uma forma direta, sendo, aliás, este o mecanismo mais comum de desintoxicação (Oost *et al.* 2003). Algumas isoenzimas de GST exibem atividade de peroxidase, ou seja, atividade de oxidação de substratos orgânicos (oxirredutases), tendo o peróxido de hidrogénio como molécula aceitadora de eletrões (Ketterer *et al.* 1983; Hayes e Pulford 1995). Desta forma, podem também contribuir de forma direta para a defesa contra as ROS.

A produção exacerbada de ROS e/ou a diminuição dos níveis de antioxidantes celulares podem conduzir ao estabelecimento de um estado de *stress* oxidativo efetivo (Livingstone 2001). Em particular, a peroxidação lipídica é considerada um importante mecanismo responsável pelo dano oxidativo; isto acontece quando a defesa antioxidante

---

<sup>8</sup> compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico

colapsa (*e.g.* porque a exposição a um agente de *stress* é elevada e contínua) e consequentemente o organismo não consegue lidar com os níveis elevados de ROS (Barata *et al.* 2005). Sabe-se que os peróxidos lipídicos produzem e decompõem-se numa variedade de substâncias. A mais importante delas é o malondialdeído (MDA) (Leibovitz e Siegel 1980), que é utilizado como biomarcador sensível para sinalizar dano oxidativo (Yu *et al.* 2009). A reação do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é um dos princípios mais utilizados para monitorizar dano oxidativo (Liu *et al.* 1997), através do ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) (Oakes e Van Der Kraak 2003).



**Figura 7** - Esquema elucidativo das reações catalisadas pelos biomarcadores enzimáticos utilizados na presente dissertação, nomeadamente a GR e a GST, no contexto da defesa contra as ROS (Adaptado de Guasch *et al.* 2017).

*D. magna*, devido ao papel que tem desempenhado enquanto modelo ecotoxicológico, oferece uma oportunidade única para avaliar a relação entre as defesas antioxidantes e as respostas de toxicidade ao nível individual à exposição a LIs. No contexto da presente Dissertação, esta espécie foi usada como modelo para uma avaliação preliminar dos mecanismos de toxicidade dos LIs, focada na confirmação do potencial dos LIs para afetar as membranas biológicas. Há vários estudos na literatura que corroboram a sensibilidade das respostas antioxidantes como indicador de *stress* oxidativo e da presença

de MDA como indicador de dano oxidativo em *Daphnia*, considerando, por exemplo, exposições a radiação UV, variação da concentração de oxigénio (Vega e Pizarro 2000; Borgeraas e Hessen 2000, 2002a, b), exposição a pesticidas (Lopes *et al.* 2007; Damásio *et al.* 2007; Neves 2014), a fármacos (Guilhermino *et al.* 1996; Oliveira *et al.* 2015) ou a metais (Guilhermino *et al.* 1997; Pavlaki *et al.* 2011). Existe, no entanto, um número reduzido de estudos que avaliem a sensibilidade das respostas antioxidantes de *Daphnia* quando expostas a LIs (Yu *et al.* 2009).

## **I.6. Organização e objetivos da dissertação**

A presente dissertação tem como primeiro objetivo validar, de uma forma integrada [*i.e.* integrando as respostas de várias espécies - *D. magna* (crustáceo), *R. subcapitata* e *C. vulgaris* (microalgas), *L. gibba* e *L. minor* (plantas aquáticas), *A. fisheri* (bactéria), *D. rerio* (peixe) e *C. fluminea* (bivalve)], as regras heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs. Para isso foram selecionados quatro LIs modelo, dois LIs à base do catião colina e dois à base do catião imidazólio, que refletem extremos de toxicidade e “extremos de estrutura” quanto ao catião, cadeia alquílica do catião e anião. Desta forma, testou-se o efeito do aumento da cadeia alquílica do catião ( $[C_2mim]Cl$  versus  $[C_{12}mim]Cl$ ), o efeito do catião ( $[C_2mim]Cl$  versus  $[Chol]Cl$ ) e o efeito do anião ( $[Chol]Cl$  versus  $[Chol][DHCit]$ ) na toxicidade de LIs para organismos representativos dos ecossistemas aquáticos. Especificamente, foi dada especial atenção à avaliação da diferença de sensibilidade de espécies modelo aquáticas aos quatro LIs selecionados, utilizando testes ecotoxicológicos focados em parâmetros sub-letais (crescimento e inibição alimentar). Após esta fase, foram construídas SSDs com o objetivo de integrar as respostas de diferentes espécies para verificar as regras heurísticas relativas à relação entre a estrutura e a toxicidade de LIs de forma consistente e ultrapassando a especificidade intrínseca da resposta de cada espécie individualmente.

Numa segunda fase do trabalho, o objetivo central foi avaliar preliminarmente o mecanismo de toxicidade que é assumido de forma generalista para todos os LIs, ou seja, ruptura membranar, estabelecendo o potencial de cada um dos quatro LIs como indutor de *stress* e dano oxidativo membranar, também analisando até que ponto as regras heurísticas consideradas inicialmente seriam aplicáveis a estes parâmetros sub-celulares.

*D. magna* foi a espécie escolhida como organismo modelo. Foram avaliados os seguintes biomarcadores: GR, GST e TBARS.

Esta Dissertação está organizada em 4 capítulos. No primeiro capítulo é apresentada uma introdução geral ao tema e a revisão bibliográfica representativa do estado de arte relevante para o enquadramento teórico do trabalho. No segundo capítulo, apresenta-se a construção da distribuição de sensibilidade de espécies para os 4 LIs estudados. No terceiro capítulo é apresentada a avaliação do *stress* e dano oxidativos promovido pela exposição aos 4 LIs selecionados. O segundo e terceiro capítulos refletem o trabalho experimental efetuado e possuem um carácter de relativa independência entre eles, estando previsto que originem dois artigos independentes a submeter a revistas internacionais indexadas no *Science Citation Index*. Assim, cada um destes capítulos é composto pelas seguintes secções próprias: introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusão. O último capítulo (IV) desta Dissertação integra e sintetiza a informação gerada ao longo do trabalho, apresentando as principais conclusões que dela se puderam retirar.

## I.7. Referências bibliográficas

- Abbott AP, Bell TJ, Handa S, Stoddart B (2005) O-Acetylation of cellulose and monosaccharides using a zinc based ionic liquid. *Green Chem* 7:705-707. doi: 10.1039/b511691k
- Abbott AP, Bell TJ, Handa S, Stoddart B (2006) Cationic functionalisation of cellulose using a choline based ionic liquid analogue. *Green Chem* 8:784-786. doi: 10.1039/b605258d
- Abelló S, Medina F, Rodríguez X, Cesteros Y, Salagre P, Sueiras Jesús E, Tichit D, Coq B (2004) Supported choline hydroxide (ionic liquid) as heterogeneous catalyst for aldol condensation reactions. *Chem Commun* 1096–1097. doi: 10.1039/B401448K
- Algae Research Supply: Algae Culture *Chlorella vulgaris* Algae Research Supply: Algae Culture *Chlorella vulgaris*. <https://algaeresearchsupply.com/products/algae-culture-chlorella-vulgaris>. Accessed 9 Oct 2018
- Alvarez-Guerra M, Irabien A (2011) Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach. *Green Chem* 13:1507-1516. doi: 10.1039/c0gc00921k
- Anthony JL, Maginn EJ, Brennecke JF (2001) Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water. *J Phys Chem B* 105:10942–10949. doi: 10.1021/jp0112368
- Arning J, Stolte S, Bösch A, Stock F, Pitner W-R, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2008) Qualitative and quantitative structure activity relationships for the inhibitory effects of cationic head groups, functionalised side chains and anions of ionic liquids on acetylcholinesterase. *Green Chem* 10:47–58. doi: 10.1039/B712109A
- Banco de Dados de Recursos de Algas Banco de Dados de Recursos de Algas. <https://shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?stockNo=NIES-35>. Accessed 16 Sep 2018
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 140:175–186. doi: 10.1016/J.CCA.2005.01.013
- Beadham I, Gurbisz M, Gathergood N (2012) Handbook of green chemistry: Designing

- safer chemicals. Wiley-VCH, Weinheim
- Blanchette B, Feng X, Singh BR (2007) Marine Glutathione S-Transferases. *Mar Biotechnol* 9:513–542. doi: 10.1007/s10126-007-9034-0
- Blanck H, Wallin G, Wängberg S-Å (1984) Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* 8:339–351. doi: 10.1016/0147-6513(84)90003-4
- Borgeraas J, Hessen DO (2000) UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *J Plankton Res* 22:1167–1183. doi: 10.1093/plankt/22.6.1167
- Borgeraas J, Hessen DO (2002a) Diurnal patterns of antioxidant activity in alpine and arctic *Daphnia magna* under in situ UV-radiation. *Arch fur Hydrobiol* 156:83–95. doi: 10.1127/0003-9136/2002/0156-0083
- Borgeraas J, Hessen DO (2002b) Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. *Hydrobiologia* 477:15–30. doi: 10.1023/A:1021056409446
- Brix K V., DeForest DK, Adams WJ (2001) Assessing acute and chronic copper risks to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups. *Environ Toxicol Chem* 20:1846–1856. doi: 10.1002/etc.5620200831
- Chapman PM, Fairbrother A, Brown D (1998) A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 17:99–108. doi: 10.1002/etc.5620170112
- Chen H, Wen Y, Waters MD, Shonnard DR (2002) Design Guidance for Chemical Processes Using Environmental and Economic Assessments. *Ind Eng Chem Res* 41:4503–4513. doi: 10.1021/ie010835y
- Cho CW, Jeon YC, Pham TPT, Vijayaraghavan K, Yun YS (2008) The ecotoxicity of ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:166–171. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.07.001
- Coleman D, Gathergood N (2010) Biodegradation studies of ionic liquids. *Chem Soc Rev* 39:600–637. doi: 10.1039/b817717c
- Couling DJ, Bernot RJ, Docherty KM, Dixon JK, Maginn EJ, (2006) Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. *Green Chem* 8:82–90. doi: 10.1039/B511333D

- Cvjetko Bubalo M, Hanousek K, Radošević K, Gaurina Srček V, Jakovljević T, Radojčić Redovniković I (2014a) Imidazolium based ionic liquids: Effects of different anions and alkyl chains lengths on the barley seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* 101:116–123. doi: 10.1016/J.ECOENV.2013.12.022
- Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Guarina Srček V (2014b) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf* 99:1–12. doi: 10.1016/J.ECOENV.2013.10.019
- Damásio J, Guilhermino L, Soares AMVM, Riva MC, Barata C (2007) Biochemical mechanisms of resistance in *Daphnia magna* exposed to the insecticide fenitrothion. *Chemosphere* 70:74–82. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.07.026
- de Maagd PG-J (2000) Bioaccumulation tests applied in whole effluent assessment: A review. *Environ Toxicol Chem* 19:25–35. doi: 10.1002/etc.5620190104
- Deetlefs M, Oggi KS-C, 2006 (2006) Ionic liquids: fact and fiction. *Chimica oggi* 24:16-23
- Deetlefs M, Seddon KR (2010) Assessing the greenness of some typical laboratory ionic liquid preparations. *Green Chem* 12:17–30. doi: 10.1039/B915049H
- Depledge MH, Fossi MC (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3:161–172. doi: 10.1007/BF00117081
- Docherty KM, Kulpa, Jr. CF (2005) Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chem* 7:185-189. doi: 10.1039/b419172b
- Domínguez de María P, Maugeri Z (2011) Ionic liquids in biotransformations: From proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Curr Opin Chem Biol* 15:220–225. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.11.008
- Duke LD, Taggart M (2000) Uncertainty factors in screening ecological risk assessments. *Environ Toxicol Chem* 19:1668–1680. doi: 10.1002/etc.5620190626
- Earle MJ, Esperança JMSS, Gilea MA, Lopes JNC, Rebelo LPN, Magee JR, Seddon KR, Widegren JA (2006) The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 439:831–834. doi: 10.1038/nature04451
- ECHA (2009) How to report read-across and categories. *Practical Guide* 6.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013) Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal* 11:1–187. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3290
- Expresso 2016 Expresso | Compensa comprar um painel solar? (parte II).



- <https://expresso.sapo.pt/economia/2016-12-23-Compensa-comprar-um-painel-solar---parte-II-#gs.YRaLSVI>. Accessed 2 Oct 2018
- Forbes TL, Forbes VE (1993) A Critique of the Use of Distribution-Based Extrapolation Models in Ecotoxicology. *Funct Ecol* 7:249-254. doi: 10.2307/2390202
- Frade RFM, Afonso CAM (2010) Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. *Hum Exp Toxicol* 29:1038–1054. doi: 10.1177/0960327110371259
- Freire MG, Carvalho PJ, Gardas RL, Marrucho IM, Santos LMNBF, Coutinho JAP (2008a) Mutual solubilities of water and the [Cnmim][Tf2N] hydrophobic ionic liquids. *J Phys Chem B* 112:1604–1610. doi: 10.1021/jp7097203
- Freire MG, Carvalho PJ, Gardas RL, Santos LMNBF, Marrucho IM, Coutinho JAP (2008b) Solubility of water in tetradecyltriethylphosphonium-based ionic liquids. *J Chem Eng Data* 53:2378–2382. doi: 10.1021/jc8002805
- Freire MG, Carvalho PJ, Silva AMS, Rebelo LPN, Marrucho IM, Coutinho JAP, Santos LMNBF (2009) Ion Specific Effects on the Mutual Solubilities of Water and Hydrophobic Ionic Liquids Ion Specific Effects on the Mutual Solubilities of Water and Hydrophobic Ionic Liquids. 202–211. doi: 10.1021/jp8080035
- Freire MG, Claudio AFM, Araujo JMM, Coutinho JAP, Marrucho IM, Lopes JNC, Rebelo LPN (2012) Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Rev* 41:4966–4995. doi: 10.1039/C2CS35151J
- Freire MG, Neves CMSS, Carvalho PJ, Gardas RL, Fernandes AM, Marrucho IM, Santos LMNBF, Coutinho JAP (2007a) Mutual Solubilities of Water and Hydrophobic Ionic Liquids. *J Phys Chem B* 111:13082–13089. doi: 10.1021/jp076271e
- Freire MG, Neves CMSS, Marrucho IM, Coutinho JAP, Fernandes AM (2010) Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids. *J Phys Chem A* 114:3744–3749. doi: 10.1021/jp903292n
- Freire MG, Santos LMNBF, Fernandes AM, Coutinho JAP, Marrucho IM, (2007b) An overview of the mutual solubilities of water-imidazolium-based ionic liquids systems. *Fluid Phase Equilib* 261:449–454. doi: 10.1016/j.fluid.2007.07.033
- Garcia MT, Gathergood N, Scammells PJ (2005) Biodegradable ionic liquids : Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem* 7:9-14. doi: 10.1039/b411922c
- Gingerich PD (2000) Arithmetic or Geometric Normality of Biological Variation: an Empirical Test of Theory. *J Theor Biol* 204:201–221. doi: 10.1006/JTBI.2000.2008

- Gorke J, Srien F, Kazlauskas R (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol Bioprocess Eng* 15:40–53. doi: 10.1007/s12257-009-3079-z
- Guasch H, Bonet B, Bonnineau C, Barral L (2017) Microbial Biomarkers. In: *Microbial Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, 251–281
- Guilhermino L, Diamantino TC, Ribeiro R, Ribeiro R, Gonçalves F, Soares AMVM (1997) Suitability of Test Media Containing EDTA for the Evaluation of Acute Metal Toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf* 38:292–295. doi: 10.1006/EESA.1997.1599
- Guilhermino L, Lopes MC, Carvalho AP, Soared AMVM (1996) Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32:727–738. doi: 10.1016/0045-6535(95)00360-6
- Haerens K, Matthijs E, Chmielarz A, Van der Bruggen B (2009) The use of ionic liquids based on choline chloride for metal deposition: A green alternative? *J Environ Manage* 90:3245–3252. doi: 10.1016/j.jenvman.2009.04.013
- Halliwell B, Gutteridge J (2015) Free radicals in biology and medicine
- Hamzé A, Rubi E, Arnal P, Boisbrun M, Carcel C, Salom-Roig X, Maynadier M, Wein S, Vial H, Calas M (2005) Mono- and bis-thiazolium salts have potent antimalarial activity. *J Med Chem* 48:3639–3643. doi: 10.1021/jm0492608
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445–520. doi: 10.3109/10409239509083491
- Herawati VE, Nugroho RA, Pinandoyo, Hutabarat J (2017) Nutritional value content, biomass production and growth performance of *Daphnia magna* cultured with different animal wastes resulted from probiotic bacteria fermentation. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 55:012004. doi: 10.1088/1755-1315/55/1/012004
- Heugens EHW, Hendriks AJ, Dekker T, Straalen NM van, Admiraal W (2001) A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Crit Rev Toxicol* 31:247–284. doi: 10.1080/20014091111695
- Hopkin SP (1993) Ecological Implications of ‘95% Protection Levels’ for Metals in Soil.

Oikos 66:137-141. doi: 10.2307/3545206

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliott D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Mortimer B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün, Z, Eser C, Geiger H, Geisler, Maria, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer, Martina, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SMJ, Enright A, Geisler R, Plasterk RHA, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJP, Crollius HR, Rogers J, Stemple DL, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJP, Crollius HR, Rogers J, Stemple DL (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498–503. doi: 10.1038/nature12111

Industrial M O que são polímeros | Mecânica Industrial.  
<https://www.mecanicaindustrial.com.br/o-que-sao-polimeros/>. Accessed 2 Oct 2018  
 ISO9439:1999 ISO 9439:1999 - Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Carbon dioxide

- evolution test. <https://www.iso.org/standard/26727.html>. Accessed 3 Oct 2018
- Jager T, Vermeire TG, Rikken MG., van der Poel P (2001) Opportunities for a probabilistic risk assessment of chemicals in the European Union. *Chemosphere* 43:257–264. doi: 10.1016/S0045-6535(00)00087-4
- Jastorff B, Mölter K, Behrend P, Bottin-Weber U, Filser J, Heimers A, Ondruschka B, Ranke J, Schaefer M, Schröder H, Stark A, Stepnowski P, Stock F, Störmann R, Stolte S, Welz-Biermann U, Ziegert S, Thöming J (2005) Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids—basis for an eco-design of sustainable products. *Green Chem* 7:362. doi: 10.1039/b418518h
- Kaliszan R, Marszałł MP, Jan Markuszewski M, Bączek T, Pernak J (2004) Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids. *J Chromatogr A* 1030:263–271. doi: 10.1016/J.CHROMA.2003.09.020
- Keskin S, Kayrak-Talay D, Akman U, Hortaçsu Ö (2007) A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *J Supercrit Fluids* 43:150–180. doi: 10.1016/J.SUPFLU.2007.05.013
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59–69. doi: 10.1289/ehp.834959
- Klapow LA, Lewis RH (1979) Analysis of Toxicity Data for California Marine Water Quality Standards. *J. (Water Pollut. Control Fed.* 51:2054–2070
- Knoben RA., Beek M., Durand A. (1998) Application of species sensitivity distributions as ecological risk assessment tool for water management. *J Hazard Mater* 61:203–207. doi: 10.1016/S0304-3894(98)00124-1
- Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13:565–571. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00353-1
- Kulacki KJ, Lamberti GA (2008) Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. *Green Chem* 10:104–110. doi: 10.1039/B709289J
- Leibovitz BE, Siegel B V. (1980) Aspects of Free Radical Reactions in Biological Systems: Aging. *J Gerontol* 35:45–56. doi: 10.1093/geronj/35.1.45
- Leron RB, Li MH (2013) Solubility of carbon dioxide in a eutectic mixture of choline chloride and glycerol at moderate pressures. *J Chem Thermodyn* 57:131–136. doi: 10.1016/j.jct.2012.08.025

- Li Z, Liu X, Pei Y, Wang J, He M (2012) Design of environmentally friendly ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient and high activity extraction of proteins. *Green Chem* 14:2941–2950. doi: 10.1039/c2gc35890e
- Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN (1997) Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Anal Biochem* 245:161–166. doi: 10.1006/ABIO.1996.9990
- Livingstone D (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Méd Vét* 154:427–430
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar Pollut Bull* 42:656–666. doi: 10.1016/S0025-326X(01)00060-1
- Livingstone DR (1991) *Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 45–185
- Lopes I, Moreira-Santos M, da Silva EM, Sousa JP, Guilhermino L, Soares AMVM, Ribeiro R (2007) In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Chemosphere* 67:2250–2256. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.12.009
- Lovelock KRJ, Deyko A, Licence P, Jones RG (2010) Vaporisation of an ionic liquid near room temperature. *Phys Chem Chem Phys* 12:8893–8901. doi: 10.1039/c004197a
- Luo Y-R, Li X-Y, Chen X-X, Zhang B-J, Sun Z-J, Wang J-J (2008) The developmental toxicity of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on *Daphnia magna*. *Environ Toxicol* 23:736–744. doi: 10.1002/tox.20382
- Malhotra S V., Kumar V (2010) A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. *Bioorg Med Chem Lett* 20:581–585. doi: 10.1016/J.BMCL.2009.11.085
- Marsh K., Boxall J., Lichtenthaler R (2004) Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. *Fluid Phase Equilib* 219:93–98. doi: 10.1016/J.FLUID.2004.02.003
- Matzke M, Arning J, Ranke J, Jastorff B, Stolte S, Matzke M, Arning J, Ranke J, Jastorff B, Stolte S (2010) Design of Inherently Safer Ionic Liquids: Toxicology and Biodegradation. In: *Handbook of Green Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany

- Matzke M, Stolte S, Thiele K, Juffernholz T, Arning J, Ranke J, Welz-Biermann U, Jastorff B (2007) The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chem* 9:1198 -1207. doi: 10.1039/b705795d
- McCarthy JF, Shugart LR (1990) Biomarkers of environmental contamination. Chelsea, MI (US); Lewia Publishers 40-49
- Meck WH, Williams CL (1999) Choline supplementation during prenatal development reduces proactive interference in spatial memory. *Dev Brain Res* 118:51–59. doi: 10.1016/S0165-3806(99)00105-4
- Migowski P, Dupont J (2007) Catalytic Applications of Metal Nanoparticles in Imidazolium Ionic Liquids. *Chem - A Eur J* 13:32–39. doi: 10.1002/chem.200601438
- Morales RC, Tambyrajah V, Jenkins PR, Davies DL, Abbott AP (2003) The regiospecific Fischer indole reaction in choline chloride·2ZnCl<sub>2</sub> with product isolation by direct sublimation from the ionic liquid. *Chem Commun* 158–159. doi: 10.1039/b313655h
- Morrissey S, Pegot B, Coleman D, Garcia MT, Ferguson D, Quilty B, Gathergood N (2009) Biodegradable, non-bactericidal oxygen-functionalised imidazolium esters: A step towards ‘greener’ ionic liquids. *Green Chem* 11:475 -483. doi: 10.1039/b812809j
- Neves MM (2014) Respostas bioquímicas e populacionais de *Daphnia* a um herbicida
- Nockemann P, Thijs B, Driesen K, Janssen CR, Van Hecke K, Van Meervelt L, Kossmann S, Kirchner B, Binnemans K (2007) Choline saccharinate and choline acesulfamate: Ionic liquids with low toxicities. *J Phys Chem B* 111:5254–5263. doi: 10.1021/jp068446a
- Norsworthy AN, Visick KL (2013) Gimme shelter: how *Vibrio fischeri* successfully navigates an animal’s multiple environments. *Front Microbiol* 4:. doi: 10.3389/fmicb.2013.00356
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63:447–463. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00204-7
- OECD 201 (2015) Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development. 1-25. doi: 10.1787/20745761
- OECD 202 (2006) Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Organization for

- Economic Cooperation and Development. 1–22. doi: 10.1787/9789264016194-en
- OECD 236 (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organization for Economic Cooperation and Development. 1–22. doi: 10.1787/20745761
- Oliveira LLD, Antunes SC, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B (2015) Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicol Environ Saf* 119:123–131. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.028
- Oost D, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicol Pharmacol* 13:57–149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Parlamento Europeu e do Conselho (2009) EC 2009. 1–50
- Paul Walden (1914) Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bull Acad Imper Sci (St Petersburg)* 1800-1850.
- Pavlaki MD, Pereira R, Loureiro S, Soares AMVM (2011) Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:99–110. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.07.010
- Peakall DB, Walker CH (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicology* 3:173–179. doi: 10.1007/BF00117082
- Pereira JFB, Vicente F, Santos-Ebinuma VC, Araújo JM, Pessoa A, Freire MG, Coutinho JAP (2013) Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts. *Process Biochem* 48:716–722. doi: 10.1016/j.procbio.2013.02.025
- Pernak J, Chwała P (2003) Synthesis and anti-microbial activities of choline-like quaternary ammonium chlorides. *Eur J Med Chem* 38:1035–1042. doi: 10.1016/j.ejmech.2003.09.004
- Petkovic M, Ferguson JL, Gunaratne HQN, Ferreira R, Leitão MC, Seddon KR, Rebelo LPN, Pereira CS (2010) Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids—toxicity and biodegradability. *Green Chem* 12:643. doi: 10.1039/b922247b
- Petkovic M, Seddon KR, Rebelo LPN, Silva Pereira C (2011) Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chem Soc Rev* 40:1383–1403. doi: 10.1039/C004968A
- Posthuma L, Suter GW, Traas TP (2002) Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis Publishers
- Prado R, Weber CC (2016) Applications of Ionic Liquids. *Appl Purification, Recover Ion*

- Liq 12:1–58. doi: 10.1016/B978-0-444-63713-0.00001-8
- Premium, Sihirbaz Hilelerini Hacamat Eden Telefon: Xperia XZ 2017 Sihirbaz Hilelerini Hacamat Eden Telefon: Xperia XZ Premium - Donanım Haberleri - Cix Site. <http://www.cixsite.com/blogs/bloglar/giris/525-sihirbaz-hilelerini-hacamat-eden-telefon-xperia-xz-premium/#comment-1>. Accessed 2 Oct 2018
- Pretti C, Chiappe C, Baldetti I, Brunini S, Monni G, Intorre L (2009) Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1170–1176. doi: 10.1016/J.ECOENV.2008.09.010
- Ranke J, Mölter K, Stock F, Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczo butt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 58:396–404. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00105-2
- Ranke J, Stolte S, Störmann R, Aming J, Jastorff B (2007) Design of sustainable chemical products - The example of ionic liquids. *Chem Rev* 107:2183–2206. doi: 10.1021/cr050942s
- Ricardo Garcia 2014 Concentração de CO2 sofreu maior aumento anual dos últimos 30 anos | Dióxido de carbono | PÚBLICO. <https://www.publico.pt/2014/09/09/ecosfera/noticia/novo-recorde-de-gases-com-efeito-de-estufa-em-2013-1669069>. Accessed 2 Oct 2018
- Rikans LE, Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1362:116–127. doi: 10.1016/S0925-4439(97)00067-7
- Romero A, Santos A, Tojo J, Rodríguez A (2008) Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *J Hazard Mater* 151:268–273. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.10.079
- Ruiz-Angel MJ, Pino V, Carda-Broch S, Berthod A (2007) Solvent systems for countercurrent chromatography: An aqueous two phase liquid system based on a room temperature ionic liquid. *J Chromatogr A* 1151:65–73. doi: 10.1016/J.CHROMA.2006.11.072
- Samorì C, Pasteris A, Galletti P, Tagliavini E (2007) Acute toxicity of oxygenated and



- nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 26:2379–2382. doi: 10.1897/07-066R2.1
- Santana DO, Silva MJM, Bocchiglieri A, Pantaleão SM, Faria RG, de Souza BB, Rocha SM, Lima LFO (2013) Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): First record for the Caatinga biome, northeastern Brazil. *Check List* 9:1072–1074. doi: 10.15560/9.5.1072
- Santos JI, Gonçalves AMM, Pereira JL, Figueiredo BFHT, e Silva FA, Coutinho JAP, Ventura SPM, Gonçalves F (2015) Environmental safety of cholinium-based ionic liquids: assessing structure–ecotoxicity relationships. *Green Chem* 17:4657–4668. doi: 10.1039/C5GC01129A
- Santos M (2011) Líquido Iônico» USP Imagens - Banco de imagens da USP. <http://www.imagens.usp.br/?p=9252>. Accessed 2 Oct 2018
- Sekar S, Surianarayanan M, Ranganathan V, MacFarlane DR, Mandal AB (2012) Choline-based ionic liquids-enhanced biodegradation of azo dyes. *Environ Sci Technol* 46:4902–4908. doi: 10.1021/es204489h
- Shahriari S, Tomé LC, Araújo JMM, Rebelo LPN, Coutinho JAP, Marrucho IM, Freire MG (2013) Aqueous biphasic systems: a benign route using cholinium-based ionic liquids. *RSC Adv* 3:1835–1843. doi: 10.1039/C2RA22972B
- Smiglak M, Pringle JM, Lu X, Han L, Zhang S, Gao H, MacFarlane DR, Rogers RD (2014) Ionic liquids for energy, materials, and medicine. *Chem Commun* 50:9228–9250. doi: 10.1039/C4CC02021A
- Smith EP, Cairns J (1993) Extrapolation methods for setting ecological standards for water quality: statistical and ecological concerns. *Ecotoxicology* 2:203–219. doi: 10.1007/BF00116425
- Stepnowski P, Zaleska A (2005) Comparison of different advanced oxidation processes for the degradation of room temperature ionic liquids. *J Photochem Photobiol A Chem* 170:45–50. doi: 10.1016/j.jphotochem.2004.07.019
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321–336. doi: 10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Stolte S, Matzke M, Arning J, Bösch A, Pitner W-R, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2007) Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chem* 9:1170–1179. doi: 10.1039/b711119c

- Suresh C, Zhao H, Gumbs A, Chetty CS, Bose HS (2012) New ionic derivatives of betulinic acid as highly potent anti-cancer agents. *Bioorganic Med Chem Lett* 22:1734–1738. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.12.102
- Tang J, Tang H, Sun W, Radosz M, Shen Y (2005) Poly(ionic liquid)s as new materials for CO<sub>2</sub> absorption. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 43:5477–5489. doi: 10.1002/pola.21031
- Thuy Pham TP, Cho CW, Yun YS (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res* 44:352–372. doi: 10.1016/j.watres.2009.09.030
- Torrecilla JS, García J, Rojo E, Rodríguez F (2009) Estimation of toxicity of ionic liquids in Leukemia Rat Cell Line and Acetylcholinesterase enzyme by principal component analysis, neural networks and multiple lineal regressions. *J Hazard Mater* 164:182–194. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.08.022
- Van der Hoeven N (2001) Estimating the 5-Percentile of the Species Sensitivity Distributions Without Any Assumptions about the Distribution. *Ecotoxicology* 10:25–34. doi: 10.1023/A:1008998405241
- Van Gestel CAM, Van Brummelen TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5:217–225. doi: 10.1007/BF00118992
- Van Rantwijk F, Lau RM, Sheldon RA (2003) Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol* 21:131–138. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00008-8
- van Rantwijk F, Sheldon RA (2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev* 107:2757–2785. doi: 10.1021/cr050946x
- van Straalen NM, Denneman CAJ (1989) Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 18:241–251. doi: 10.1016/0147-6513(89)90018-3
- Vega MP, Pizarro RA (2000) Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J Photochem Photobiol B Biol* 54:121–125. doi: 10.1016/S1011-1344(00)00005-1
- Ventura SPM, de Barros RLF, Sintra T, Soares CMF, Lima AS, Coutinho JAP (2012a) Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: Agar diffusion test adaptation. *Ecotoxicol Environ Saf* 83:55–62. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.06.002
- Ventura SPM, e Silva FA, Gonçalves AMM, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP (2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine

- bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 102:48–54. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.003
- Ventura SPM, Gonçalves AMM, Gonçalves F, Coutinho JAP (2010) Assessing the toxicity on [C3mim][Tf2N] to aquatic organisms of different trophic levels. *Aquat Toxicol* 96:290–297. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.11.008
- Ventura SPM, Gonçalves AMM, Sintra T, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP (2013) Designing ionic liquids: The chemical structure role in the toxicity. *Ecotoxicology* 22:1–12. doi: 10.1007/s10646-012-0997-x
- Ventura SPMM, Gardas RL, Gonçalves F, Coutinho JAPP (2011) Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: Octanol-water distribution coefficients and toxicological data. *J Chem Technol Biotechnol* 86:957–963. doi: 10.1002/jctb.2606
- Ventura SPMM, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CAMM, Gonçalves F, Coutinho João APP (2012b) Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 76:162–168. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.10.006
- Verma R, Suthar S (2015) Lead and cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexandria Eng J* 54:1297–1304. doi: 10.1016/J.AEJ.2015.09.014
- Viau L, Tourné-Péteilh C, Devoisselle J-M, Vioux A (2010) Ionogels as drug delivery system: one-step sol–gel synthesis using imidazolium ibuprofenate ionic liquid. *Chem Commun* 46:228–230. doi: 10.1039/B913879J
- Vijayaraghavan R, Thompson BC, MacFarlane DR, Kumar R, Surianarayanan M, Aishwarya S, Sehgal PK (2010) Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. *Chem Commun* 46:294–296. doi: 10.1039/B910601D
- Wang J, Pei Y, Zhao Y, Hu Z (2005) Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media. *Green Chem* 7:196. doi: 10.1039/b415842c
- Wasserscheid P, Keim W (2000) Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew Chemie* 39:3772–3789. doi: 10.1002/1521-3773(20001103)39:21<3772::AID-ANIE3772>3.0.CO;2-5
- Wasserscheid P, Welton T (Thomas) (2007) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH
- Weaver KD, Kim HJ, Sun J, MacFarlane DR, Elliott GD (2010) Cyto-toxicity and biocompatibility of a family of choline phosphate ionic liquids designed for

- pharmaceutical applications. *Green Chem* 12:507–513. doi: 10.1039/b918726j
- Wei Z, Zu Y, Fu Y, Wang W, Luo M, Zhao C, Pan Y (2013) Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis. *Sep Purif Technol* 102:75–81. doi: 10.1016/J.SEPPUR.2012.09.031
- Wells AS, Coombe VT (2006) On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids. *Org Process Res Dev* 10:794–798. doi: 10.1021/op060048i
- Wilkes JS (2002) A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem* 4:73–80. doi: 10.1039/b110838g
- Wilkes JS, Levisky JA, Wilson RA, Hussey CL (1982) Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorg Chem* 21:1263–1264. doi: 10.1021/ic00133a078
- Hershberger LW, Arce GT, Du Pont de Nemours, E. I (1993) Benomyl. World Health Organization
- Yan F, Xia S, Wang Q, Ma P (2012) Predicting toxicity of ionic liquids in acetylcholinesterase enzyme by the quantitative structure-activity relationship method using topological indexes. *J Chem Eng Data* 57:2252–2257. doi: 10.1021/je3002046
- Yu M, Wang SH, Luo YR, Han YW, Li XY, Zhang BJ, Wang JJ (2009) Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1798–1804. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.05.002
- Zdanowicz M, Szychaj T, Mąka H (2016) Imidazole-based deep eutectic solvents for starch dissolution and plasticization. *Carbohydr Polym* 140:416–423. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2015.12.036
- Zeisel SH, Da Costa KA (2009) Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 67:615–623. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x
- Zhang Y, Hu Y, Yang B, Ma F, Lu P, Li L, Wan C, Rayner S, Chen S (2010) Duckweed (*Lemna minor*) as a Model Plant System for the Study of Human Microbial Pathogenesis. *PLoS One* 5:e13527. doi: 10.1371/journal.pone.0013527
- Zhao H, Baker GA, Holmes S (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and

enzymatic preparation of biodiesel. *Org Biomol Chem* 9:1908. doi:  
10.1039/c0ob01011a

## **Capítulo II. Avaliação da aplicabilidade de regras heurísticas sobre a ecotoxicidade de líquidos iônicos utilizando distribuição de sensibilidade de espécies**

### **Resumo**

A toxicidade dos Líquidos Iônicos (LIs) para organismos aquáticos tem sido alvo de bastante interesse, podendo, geralmente, atribuir o conceito de carácter “verde”. No entanto, a abordagem utilizada é a de avaliação da toxicidade para um reduzido número de espécies, o que é limitativo dada a variação de sensibilidade que diferentes espécies podem exibir a diferentes classes de LIs. Assim, o principal objetivo do presente estudo é validar, de uma forma integrada (*i.e.*, integrando as respostas de várias espécies), as regras heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs (efeito do anião, do catião e da extensão da cadeia alquílica do catião). Para isso, foram selecionados 4 LIs modelo e a sua toxicidade para uma grande variedade de espécies foi determinada, o que permitiu o desenvolvimento de curvas de distribuição de sensibilidade de espécies e, consequentemente, a determinação de valores de HC<sub>5</sub> e HC<sub>50</sub>. Esta abordagem integradora permite estabelecer relações entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade. Observou-se que os valores de EC<sub>50</sub> apresentavam uma ampla gama de variação, sendo que a espécie mais sensível a cada LI era variável. Os valores de HC<sub>5</sub> variaram 4 ordens de grandeza, entre  $2,421 \times 10^{-3}$  mg/L (cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio – [C<sub>12</sub>mim]Cl) e 73,00 mg/L (cloreto de colina). A variação da toxicidade, no global, apresenta a seguinte ordem: cloreto de colina  $\approx$  dihidrogenocitrato de colina  $\leq$  cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio < 1-dodecil-3-metilimidazólio. Assim, foi possível validar as regras heurísticas reconhecidas inicialmente, não deixando de ser preocupante a elevada toxicidade (comparativamente) do [C<sub>12</sub>mim]Cl. Devido a estas diferenças de toxicidade entre os diferentes LIs é preponderante estender este tipo de abordagens integradora a outros LIs.

**Palavras-chave** | colinas; imidazólios; Microtox; testes de inibição do crescimento; testes de inibição alimentar; ensaio de toxicidade em embriões de peixe; curvas de distribuição de sensibilidade de espécies

## II.1. Introdução

Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais líquidos a temperaturas inferiores a 100°C; inclusive alguns são líquidos à temperatura ambiente. Esta nova classe de produtos químicos é considerada uma versão melhorada dos solventes orgânicos tradicionais, muitos dos quais são voláteis e com elevada toxicidade (Chen *et al.* 2002; Kragl *et al.* 2002; Van Rantwijk *et al.* 2003; Wasserscheid e Welton 2007; Freire *et al.* 2012; Santos *et al.* 2015). Os LIs são, assim, substitutos mais sustentáveis dos solventes orgânicos voláteis (Freire *et al.* 2012), o que se deve a várias características, tais como baixa pressão de vapor, menor atração intermolecular (Ranke *et al.* 2004; Ventura *et al.* 2014), não-inflamabilidade e não explosividade (Deetlefs *et al.* 2006; Earle *et al.* 2006; Lovelock *et al.* 2010), entre outras. Além disso, os LIs apresentam a vantagem da sua estrutura química, e consequentemente as suas propriedades, ser facilmente alterada, motivo pelo qual estes compostos são designados de *designer solvents* (Tundo *et al.* 2007; van Rantwijk e Sheldon 2007; Plechkova e Seddon 2008). Esta designação deve-se ao facto de ser possível sintetizar inúmeras estruturas alternativas alterando o catião, o anião e/ou a cadeia alquílica do catião/anião. A possibilidade de alterar, de forma pouco limitada, a estrutura dos LIs é muito relevante sob o ponto de vista da aplicação, já que podem ser afinados para responderem o melhor possível ou o mais eficientemente possível a essa aplicação. No entanto, isso gera um problema de avaliação do potencial risco que estas substâncias podem representar para o ambiente porque seria teoricamente necessário avaliar o risco que cada uma das muitas variantes pode representar.

No sentido de contornar a potencial dificuldade associada à avaliação de risco das inúmeras variantes de LIs que podem ser desenvolvidas e sintetizadas, têm sido enunciadas regras heurísticas que descrevem a toxicidade de LIs em função do anião, do catião e da cadeia alquílica do catião. Por exemplo, o aumento da cadeia alquílica do catião conduz ao aumento da toxicidade de colinas e imidazólios (Kulacki e Lamberti 2008; Pham *et al.* 2008; Silva *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015) para *A. fischeri* (Samorì *et al.* 2007; Ventura *et al.* 2012, 2014) e *R. subcapitata* (Cho *et al.* 2008; Latała *et al.* 2009; Pretti *et al.* 2009). No entanto, já foram registadas inconsistências nestas regras dependendo do organismo testado. Assim, é necessário confirmar se abordagens integradoras de avaliação de ecotoxicidade confirmam ou não estas regras. Se sim, isso permitirá estabelecer relações realmente fidedignas entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade que facilitam a

previsão dos potenciais efeitos ambientais, dispensando ou reduzindo a necessidade de os avaliar experimentalmente. Foi neste contexto que se desenvolveu o presente estudo, que pretende analisar até que ponto as regras heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs se mantêm quando as respostas de diferentes organismos aquáticos são integradas.

No âmbito da ecotoxicidade aquática existe ainda uma grande incerteza quanto aos efeitos e mecanismos de toxicidade dos LIs em diferentes espécies e níveis tróficos (Beadham *et al.* 2012). Por esta razão, foram selecionadas oito espécies diferentes que representam o compartimento aquático: duas microalgas verdes - *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*; duas espécies de macrófitas - *Lemna minor* e *Lemna gibba*; uma espécie de cladóceros - *Daphnia magna*; uma espécie de peixe - *Danio rerio*; uma espécie de bivalve - *Corbicula fluminea*; e uma espécie de bactéria - *Aliivibrio fischeri*. Este conjunto de espécies reflete a intenção de abranger diversos níveis funcionais e posições na teia trófica aquática, representando de uma forma abrangente comunidades potencialmente afetadas pela contaminação do compartimento aquático por LIs. A relevância do estudo de organismos com diferentes posições na teia trófica está relacionada com a análise de potenciais desequilíbrios nas relações tróficas (transferências de massa e energia) nos ecossistemas, o que estende o significado das respostas de cada organismo testado à regulação funcional do ecossistema aquático (Knoben *et al.* 1998; Van der Hoeven 2001). Em adição, esta variedade de organismos traduz-se na cobertura de diversos mecanismos de *uptake* de produtos químicos, o que pode afetar a magnitude do efeito tóxico (Santos *et al.* 2015). Por exemplo, no contexto dos produtores, foram consideradas as microalgas, onde a internalização só poderá acontecer por contacto, e as macrófitas, onde a internalização pode também acontecer via sistémica. A seleção destas espécies também obedeceu ao facto de os procedimentos de teste estarem amplamente desenvolvidos, documentados, normalizados e disponíveis (*e.g.* OECD 2006, 2013, 2015), sendo fáceis de implementar. Adicionalmente, os organismos selecionados exibem uma elevada sensibilidade a diferentes contaminantes e a sua manutenção e/ou manuseamento em laboratório é simples, o que contribui para a sua frequente utilização em avaliações ecotoxicológicas de químicos diversos.

Como ferramenta integradora de referências de ecotoxicidade (recolhidas na literatura ou obtidas experimentalmente) de LIs, foram utilizadas distribuições de sensibilidade de espécies (SSDs). Uma distribuição de sensibilidade de espécie (SSD) é



uma distribuição estatística que descreve a variação da resposta (sensibilidade) de um conjunto de espécies (representativa de comunidades naturais) à exposição a um determinado composto ou mistura de compostos/matriz natural (Posthuma *et al.* 2002). Uma das mais importantes aplicações das SSDs decorre da sua integração como ferramenta da linha de evidência ecotoxicológica da análise de risco ambiental (Brix *et al.* 2001). Neste contexto, o HC<sub>5</sub> é normalmente considerado para definir níveis seguros dos contaminantes no ambiente (Posthuma *et al.* 2002). O HC<sub>5</sub> corresponde à concentração a que 5% das espécies representativas da comunidade visada (*e.g.* comunidades aquáticas) são afetadas ao nível definido pelos dados de entrada (se estes forem valores de EC<sub>50</sub>, então as espécies são afetadas negativamente em 50% do parâmetro ecofisiológico considerado para construir a SSD). Pelo facto de constituírem um parâmetro integrativo, estes valores de HC<sub>5</sub> e os valores de HC<sub>50</sub> (que por não se encontrarem nos extremos da curva de distribuição, oferecem em geral previsões mais robustas) podem ser usados como referência para explorar as tendências de estrutura-ecotoxicidade, particularmente quando não há consistência entre as respostas dadas pelos diferentes sistemas biológicos testados.

Assim, o objetivo específico do presente trabalho foi validar as regras heurísticas descritas para a relação entre a estrutura e ecotoxicidade de LIs, utilizando as SSD como abordagem integradora e baseando a sua construção em parâmetros sub-letais; estes são geralmente entendidos como mais protetores da biota aquática do que os parâmetros letais, logo foi assumida uma abordagem conservativa. Para isso foram selecionados quatro LIs modelo: dois LIs à base de colina e dois à base de imidazólio, que refletem extremos de toxicidade e extremos de estrutura quanto ao anião, catião e, cadeia alquílica do catião (Ventura *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015). A aplicação da abordagem integradora das SSDs permite verificar as regras heurísticas descritas anteriormente.

## II.2. Materiais e Métodos

### II.2.1. Recolha de valores de EC<sub>50</sub> da literatura

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica abrangendo todos os valores de EC<sub>50</sub> fidedignos de espécies aquáticas (*A. fischeri*, *R. subcapitata*, *C. vulgaris*, *L. minor*, *L. gibba*, *D. magna*, *C. fluminea* e *D. rerio*) que já estavam registados na literatura para cada um dos 4 LIs selecionados (cloreto de colina - [Chol]Cl, dihidrogenocitrato de colina - [Chol][DHCit], cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio - [C<sub>2</sub>mim]Cl e cloreto de 1-dodecil-3-

metilimidazólio - [C<sub>12</sub>mim]Cl). De entre as espécies de interesse, as espécies mais frequentemente estudadas na bibliografia foram *R. subcapitata*, *L. minor*, *D. magna* e *A. fischeri* (Ventura *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015). Foram tidos em atenção os seguintes critérios de seleção: testes em que se avaliaram parâmetros não letais; valores de EC<sub>50</sub> calculados recorrendo ao ajuste de modelos preditivos adequados (nomeadamente, funções de regressão não-linear, dada a natureza contínua das variáveis), e com a indicação de intervalos de confiança; existência de informação suficiente sobre as soluções testadas, que permitisse a identificação inequívoca do LI testado e suas concentrações. A partir desta base de dados, seleccionámos os ensaios necessários para completar a base de dados ecotoxicológica para cada um dos quatro LIs. Estes ensaios foram realizados conforme descrito abaixo.

## II.2.2. Ensaios laboratoriais

### II.2.2.1. Químicos

Os LIs foram cedidos pelo Departamento de Química da Universidade de Aveiro, através do grupo de investigação *Process and Product Applied Thermodynamics* (PATH). Foram utilizados os seguintes LIs: [Chol]Cl (CAS<sup>9</sup>: 67-48-1, grau de pureza igual a 98%); [Chol][DHCit] (CAS 77-91-8, grau de pureza 99,0%); [C<sub>2</sub>mim]Cl (CAS 65039-09-0, grau de pureza 98,0%); [C<sub>12</sub>mim]Cl (CAS 81995-09-7, grau de pureza superior a 98%). Na **Figura 2** no **Capítulo I** estão representadas as estruturas químicas dos 4 LIs.

Para a realização de cada ensaio ecotoxicológico foram preparadas soluções stock de cada LI nos meios de cultura adequados a cada espécie. Para cada teste ecotoxicológico (exceto Microtox®) foram realizados testes preliminares com uma gama alargada de concentrações de cada LI com o intuito de seleccionar a gama de concentrações mais adequada para os ensaios finais que se apresentam relativos a cada espécie/LI.

### II.2.2.2. Teste de inibição da bioluminescência (Microtox)

Para testar a inibição da bioluminescência da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* utilizámos o Microtox® Toxicity Test, um ensaio agudo que mede o efeito de substâncias

---

<sup>9</sup> O número CAS representa o registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society*.

tóxicas e amostras ambientais em organismos bioluminescentes. Este teste foi realizado apenas para dois dos LIs: [C<sub>2</sub>mim]Cl e [C<sub>12</sub>mim]Cl. As bactérias foram adquiridas em kits desidratados (Modernwater, Cambridge, UK), que foram armazenados a -20 °C e reidratados imediatamente antes do teste. Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo do teste básico de 81,9% (AZUR Environmental 1998), utilizando o *Microtox 500 Analyzer*. Resumidamente, as bactérias foram expostas a uma série de soluções diluídas (de 0 a 81,9% da solução *stock*, **Tabela 1**). As concentrações desses *stocks* foram ajustadas para capturar a curva da amplitude total de resposta nos testes. As diluições foram elaboradas seguindo o protocolo do fabricante, com o diluente fornecido (solução de NaCl a 2% em H<sub>2</sub>O), depois de um primeiro passo de ajuste da pressão osmótica das amostras a 2% de NaCl utilizando a solução de ajuste osmótico; isto garante que o teste seja executado em condições osmóticas ótimas para as bactérias, *i.e.*, NaCl a 2% (Johnson 2005). As medições da emissão de luminescência das bactérias foram registradas e comparadas com a emissão de luz de uma amostra de controle (bactérias no diluente) após 5, 15 e 30 min de exposição. Estes dados foram utilizados para estimar as concentrações que provocam 50% de inibição da bioluminescência (EC<sub>50</sub>), conforme indicado no item **II.2.3.1**.

**Tabela 1** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes de inibição da bioluminescência com *A. fischeri* (solução stock = 6,183 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução stock = 40,00 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0
1	197,8	0,1280
2	395,6	0,2559
3	791,4	0,5120
4	1582	1,024
5	3165	2,047
6	6331	4,096
7	1,266×10 <sup>4</sup>	8,192
8	2,532×10 <sup>4</sup>	16,38
9	5,064×10 <sup>4</sup>	32,76

### II.2.2.3. Teste de inibição do crescimento de microalgas

O efeito dos quatro LIs no crescimento de microalgas foi avaliado utilizando duas espécies de microalgas verdes, *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris* (que podem exibir sensibilidade distinta a diferentes químicos (Kulacki e Lamberti 2008), e segundo protocolos padronizados (OECD 2015). As microalgas usadas têm sido mantidas no laboratório em culturas semi-estáticas, em meio MBL (Woods Hole Marine Biological Laboratory medium; Janet *et al.* 1973), com renovação semanal do meio de cultura. As culturas são mantidas a  $20 \pm 2$  °C e sob a luz branca e fluorescente seguindo um fotoperíodo de 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup> (Luz: Escuro). Foi seguido o mesmo procedimento experimental nos testes com ambas as espécies, exceto quando indicado em contrário. A preparação das soluções para a realização dos testes (preparação das soluções *stock* e respectivas diluições) foi feita em MBL.

Nos testes foram usadas algas na fase exponencial do crescimento (cerca de 4 dias após repicagem). Para tal, cerca de 4 dias antes de iniciar um teste foi necessário preparar o inóculo, por repicagem de um inóculo existente. O inóculo de algas foi preparado transferindo um pequeno volume de algas de um inóculo existente (com cerca de 7 dias) para um erlenmeyer contendo cerca de 50 mL de MBL. Este processo é feito à chama (assépsia) ou em câmara de fluxo laminar para prevenir contaminação por outros microrganismos. O inóculo foi mantido nas mesmas condições de luz e temperatura que as culturas.

Os testes foram iniciados com uma densidade celular de  $1 \times 10^4$  células/mL. Para tal, foi necessário preparar uma suspensão com  $1 \times 10^5$  células/mL, a partir do inóculo, o que pressupõe a determinação da densidade de algas no inóculo. Esta determinação realiza-se por contagem ao microscópio utilizando uma câmara de Neubauer. No **Anexo II.6.1.** são fornecidos mais detalhes acerca da contagem de células com recurso à câmara de Neubauer e da preparação do teste. Os testes foram realizados em microplacas de 24 poços, sendo o volume final de 1 mL em cada poço. Foram utilizados apenas os poços centrais (ver **Anexo II.6.1. e Figura 10**); os poços mais afastados do centro continham apenas água destilada, para mitigar a evaporação nos poços centrais. As algas foram expostas a várias concentrações de cada composto (**Tabelas 2 e 3**). Para cada concentração foram utilizadas três réplicas, um controlo (com algas e sem LI) e um branco (sem algas e com LI). O branco foi utilizado para descontar a eventual absorvância do LI ao valor da absorvância

em cada réplica, aquando da medição da absorvância no espectrofotómetro. As microplacas foram colocadas em câmara fitoclimática durante o período de exposição de 96 h, sob luz contínua ( $n = 5$ ; média = 2750 lux; desvio padrão = 934,1 lux) e temperatura estável ( $23 \pm 1$  °C). As algas foram ressuspensas diariamente, utilizando uma micropipeta, para evitar a sua sedimentação e promover trocas gasosas. No final do período de exposição, foi registada a absorvância a 440 nm (espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu Corporation, Japão). Os valores de absorvância (ABS) foram convertidos em densidade celular (células/mL) usando a **equação 1** (Castro *et al.* 2018).

(densidade celular, células/mL) =  $6931 + 23179166 \times \text{ABS} - 9972459 \times \text{ABS}^2$ ,  
(equação 1).

**Tabela 2** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes de inibição do crescimento com *R. subcapitata* (solução *stock* = 500,0 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução *stock* = 0,6000 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0
1	10,40	$1,317 \times 10^{-2}$
2	15,61	$1,976 \times 10^{-2}$
3	23,41	$2,963 \times 10^{-2}$
4	35,12	$4,445 \times 10^{-2}$
5	52,67	$6,667 \times 10^{-2}$
6	79,01	0,1000
7	118,5	0,1500
8	177,8	0,2250
9	266,7	0,3375
10	400,0	0,5063

**Tabela 3** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes de inibição do crescimento com *C. vulgaris* (solução *stock* =  $1,700 \times 10^4$  mg/L para [Chol]Cl; solução *stock* =  $1,200 \times 10^4$  mg/L para [Chol][DHCit]; solução *stock* = 500,0 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução *stock* = 0,5000 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	390,2	260,1	9,104	$7,804 \times 10^{-3}$
2	585,3	390,2	13,66	$1,171 \times 10^{-2}$
3	877,9	585,3	20,48	$1,756 \times 10^{-2}$
4	1317	877,9	30,73	$2,634 \times 10^{-2}$
5	1975	1317	46,09	$3,951 \times 10^{-2}$
6	2963	1975	69,14	$5,926 \times 10^{-2}$
7	4444	2963	103,7	$8,889 \times 10^{-2}$
8	6667	4444	155,6	0,1333
9	$1,000 \times 10^4$	6667	233,3	0,2000
10	$1,500 \times 10^4$	$1,000 \times 10^4$	350,0	0,3000

Nos testes realizados com o [Chol][DHCit], a densidade de microalgas foi determinada por contagem ao microscópio, pois este LI interfere com a medição de absorvância a 440 nm. Para tal, após ressuspensão das algas em cada frasco, foi retirada uma amostra para um eppendorf, ao qual se adicionou solução de lugol para fixação e preservação (100 µl de lugol por 500 µl de amostra). Logo que possível, a contagem das microalgas foi realizada ao microscópio, utilizando uma câmara de Neubauer. A diluição provocada pela adição da solução de lugol foi considerada na determinação da densidade celular. Os valores de densidade obtidos (expressos em células/mL) permitiram a determinação da produtividade (células/mL), usando a **equação 2**:

$$\text{Produtividade} = \text{densidade celular (72 h)} - \text{densidade celular (0 h)} \text{ (equação 2),}$$

sendo que densidade celular (0 h) se refere à densidade inicial, *i.e.*,  $1 \times 10^4$  células/mL. Os valores de produtividade foram utilizados para determinação dos valores de EC<sub>50</sub>.

#### II.2.2.4. Teste de inibição do crescimento de macrófitas aquáticas

O efeito dos LIs no crescimento de macrófitas aquáticas foi avaliado utilizando duas espécies: *Lemna gibba* e *Lemna minor*, ambas recomendadas pela norma OECD 221 (OECD 2006). Ambas as espécies de *Lemna* são mantidas no laboratório em meio

*Steinberg* estéril (OECD 2006) em *erlenmeyers* de 500 mL, a  $20 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup>. As culturas são renovadas semanalmente.

O procedimento experimental usado para ambas as espécies foi idêntico, salvo indicação em contrário, tendo sido realizado de acordo com a norma OECD 221 (OECD 2006). Os testes foram realizados em microplacas de 6 poços, sendo o volume total por poço de 10 mL. As macrófitas foram expostas a várias concentrações de cada composto (**Tabelas 4 e 5**), estabelecidas em triplicado. Foi sempre incluído um tratamento de controlo (*Steinberg*), para o qual foram estabelecidas seis réplicas. As soluções *stock*, bem como as suas diluições, foram preparadas com meio *Steinberg*. Em cada poço foram colocadas 3 colónias, cada uma com 3 frondes. As microplacas foram mantidas numa câmara fitoclimática a  $23 \pm 1$ °C, sob luz contínua fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas com uma intensidade de luz média igual a 2750 lux (desvio padrão = 934,1 lux; n = 5) em pontos à mesma distância da fonte de luz<sup>10</sup>. O período de exposição foi de 7 dias.

**Tabela 4** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes com *L. minor* (solução *stock* = 1500 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução *stock* = 25,00 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0
1	20,81	0,2890
2	31,22	0,4335
3	46,82	0,6503
4	70,23	0,9755
5	105,4	1,463
6	158,0	2,195
7	237,0	3,292
8	355,6	4,939
9	533,3	7,408
10	800,0	11,11
11	1200	16,67
12	-	25,00

<sup>10</sup> A placa de teste deve ser tapada para minimizar a evaporação e a contaminação acidental, mas permitindo a troca de ar necessária.

**Tabela 5** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes com *L. gibba* (solução *stock* = 4000 mg/L para [Chol]Cl; solução *stock* =  $2,000 \times 10^4$  mg/L para [Chol][DHCit]; solução *stock* = 300,0 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução *stock* = 10,00 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	104,1	136,4	4,366	0,1455
2	156,1	218,3	6,985	0,2328
3	234,1	349,3	11,18	0,3725
4	351,2	558,8	17,88	0,5960
5	526,8	894,1	28,61	0,9537
6	790,1	1431	45,78	1,526
7	1185	2289	73,24	2,441
8	1777	3662	117,2	3,906
9	2666	5859	187,5	6,250
10	4000	9375	300,0	10,00
11	-	1500	-	-

No final do ensaio, foi registado o número de folhas por réplica. O peso seco das plantas foi também determinado: todas as colónias foram retiradas de cada um dos poços de teste e lavadas em água destilada; todos os fragmentos de raízes foram incluídos. As plantas foram colocadas a secar a 50 °C durante aproximadamente 3 dias (até se obter peso contante). Após a secagem, as plantas foram pesadas, sendo o peso seco expresso com uma precisão de pelo menos 0,1 mg (OECD 2006).

Os valores de número de folhas e peso seco após 7 dias foram utilizados para calcular a inibição do crescimento. Os dados foram expressos em termos de incremento de biomassa, *i.e.*, subtraindo o valor inicial (número de folhas ou peso seco) ao valor final. Os dados relativos à produtividade, em termos de número de folhas e peso seco, foram utilizados para cálculo dos valores de EC<sub>50</sub>.

#### II.2.2.5. Teste de inibição alimentar pós-exposição em *Daphnia magna*

O efeito de cada composto na taxa de ingestão de *Daphnia magna* foi avaliado durante o período de pós-exposição.

O crustáceo de água doce *D. magna* (clone *Beak*) tem sido mantido no nosso laboratório há vários anos em culturas monoclonais. Os dafnídeos foram cultivados em água dura ASTM (American Society for Testing e Materials 1980) enriquecidos com vitaminas (Elendt e Bias 1990) e suplementado com um aditivo orgânico (Baird *et al.*



1989) num volume total de cerca de 800 mL. As culturas foram mantidas a uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C e com fotoperíodo de 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup>, fornecido por luzes brancas fluorescentes frias. A renovação do meio de cultura foi realizada três vezes por semana. Durante a renovação do meio os organismos foram alimentados com suspensões concentradas da alga *R. subcapitata* ( $3 \times 10^5$  células/mL), a qual é cultivada ciclicamente em meio *Woods Hole MBL* (MBL; Janet *et al.* 1973). Apenas os neonatos da terceira à quinta ninhada foram utilizados nos testes.

Os efeitos dos quatro compostos testados na taxa de ingestão dos dafnídeos (período de pós-exposição) foi investigado usando juvenis no quarto estágio de desenvolvimento. Para tal, neonatos com menos 24 h de idade foram retirados da cultura principal para um frasco com cerca de 800 mL de água dura ASTM, tendo sido mantidos nas mesmas condições que as culturas até atingirem a quarta fase desenvolvimento - 4 a 5 dias de idade. Este estágio da vida é adequado para esta avaliação experimental porque permite avaliar a inibição da alimentação em bioensaios evitando a interferência da muda da carapaça (altura em que pode haver variação na sensibilidade dos organismos) nas taxas de ingestão das dáfias, como sugerido por McWilliam e Baird (2002a; b). Quando atingiram o quarto estágio de desenvolvimento, grupos de 5 juvenis foram transferidos aleatoriamente para frascos de vidro com 50 ml de água dura ASTM contendo uma determinada concentração do composto a testar. As gamas de concentrações utilizadas para cada composto são apresentadas na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Gama de concentrações utilizada nas exposições que precederam os testes de inibição alimentar em *D. magna* durante o período de pós-exposição (solução *stock* = 500,0 mg/L para [Chol]Cl; solução *stock* = 2000 mg/L para [Chol][DHCit]; solução *stock* = 2000 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução *stock* = 100,0 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	172,7	92,27	66,41	1,756
2	241,7	130,2	92,97	2,634
3	338,4	182,2	130,2	3,951
4	473,8	255,1	182,2	5,926
5	663,3	357,1	255,1	8,889
6	928,6	500,0	357,1	13,33
7	1300	700,0	500,0	20,00

Estas gamas foram obtidas por diluição de uma solução *stock* preparada em água dura ASTM, tendo sido estabelecidas após a realização de testes preliminares. Para cada concentração (incluindo controlo) foram utilizadas cinco réplicas (frasco contendo o composto e dáfias) e foram também incluídos 8 brancos por teste (com composto, mas sem dáfias; um por tratamento), os quais desempenharam um papel de referência. Esta referência foi utilizada para descontar a eventual absorvância do LI ao valor da absorvância em cada réplica, aquando da medição da absorvância no espectrofotómetro. O teste foi mantido durante 24 h a  $20 \pm 2$  °C (período de exposição). Após o período de exposição, as dáfias foram transferidas para frascos de vidro de 50 ml contendo ASTM com alimento (*R. subcapitata*, concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL) e mantidas no escuro (para evitar o crescimento das algas durante o ensaio) durante 4 h (pós-exposição) a  $20 \pm 2$  °C. Após este período, os juvenis foram retirados e cada frasco de teste foi agitado vigorosamente para ressuspender as microalgas. A densidade final de microalgas foi estimada a partir dos valores de absorvância medidos a 440 nm (espectrofotómetro UV-1800; Shimadzu Corporation, Japão), aplicando uma curva de calibração previamente estabelecida para o aparelho utilizado (**equação 1**, Castro *et al.* 2018). Para o LI [Chol][DHCit] a densidade de algas foi determinada através da contagem das mesmas em cada tratamento e réplica. A partir dos valores de densidade final de microalgas em cada réplica, e de acordo com Allen e colaboradores (1995), foram determinadas as taxas de ingestão (células/ind/h), as quais foram utilizadas para determinação dos valores de EC<sub>50</sub>.

#### II.2.2.6. Teste de inibição alimentar em *Corbicula fluminea*

O efeito de cada composto na taxa de ingestão de *C. fluminea* foi avaliado seguindo o procedimento experimental reportado em literatura (Castro *et al.* 2018). Este parâmetro é indicado como sensível a vários compostos químicos, sendo a sua determinação rápida e simples (Castro *et al.* 2018).

As amêijoas asiáticas (*C. fluminea*), com comprimento de concha entre 10 e 25 mm, foram colhidas numa vala rasa de água doce perto de Mira (no centro litoral de Portugal; N 40° 24' 55", W 8° 45' 04"). A população estabelecida apresenta densidades que atingem mais de 2000 indivíduos/m<sup>2</sup> (Rosa *et al.* 2014). Os moluscos foram recolhidos peneirando o sedimento através de um saco de malha de 1 cm e separados por classes de tamanho de casca (comprimento de concha entre 20 e 24 mm). Os moluscos foram transportados para o laboratório em baldes plásticos cheios de água local e gradualmente aclimatados<sup>11</sup> por 15 dias. As amêijoas foram mantidas em laboratório em baldes plásticos de 20 litros com água da torneira desclorinada, sob arejamento permanente e regime de temperatura controlada ( $20 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup>). Duas vezes por semana, a água foi renovada e os moluscos foram alimentados com uma ração *ad libitum* de *R. subcapitata*, a partir de suspensões concentradas, obtidas de acordo com o procedimento experimental descrito da secção II.2.2.3. Os animais mortos foram regularmente removidos dos baldes. Antes de qualquer ensaio, o desempenho do lote (sobrevivência e alimentação) foi seguido durante um período de quarentena de duas semanas para confirmar a boa saúde dos moluscos.

Por razões logísticas, foram realizadas experiências para cada substância tóxica de forma independente, mas cada experiência utilizou o mesmo lote de amêijoas (isto é, amêijoas que foram recolhidas no mesmo dia e mantidas no laboratório nas mesmas condições). Utilizaram-se amêijoas pertencentes a uma classe de tamanho única (20–24 mm), conforme confirmado com uma craveira. A gama final de concentrações de cada LI (Tabela 7) foi estabelecida com base nos resultados de testes preliminares.

Os ensaios foram realizados segundo um desenho experimental em blocos temporais, seguindo os procedimentos descritos na bibliografia (Castro *et al.* 2018). Foram

---

<sup>11</sup> Aclimação: *C. fluminea* ficaram 15 dias em período de aclimação ao meio e às condições do laboratório –  $20 \pm 2$  °C; fotoperíodo 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup>. A cada 3 dias renovava-se cerca de metade do meio com água desclorinada, de modo a ir aumentando, gradualmente, a percentagem reativa de água desclorinada no meio.

usados quatro blocos (réplicas temporais), com dois blocos medidos em cada dia. Cada bloco era constituído por sete tratamentos, sendo um controlo e 6 concentrações crescentes dos quatro LIs (frasco contendo 100 mL de água dura ASTM com o respetivo LI e um molusco). Para cada tratamento, 5 réplicas e um branco (frasco sem molusco, mas com algas e a respetiva concentração de LI). Em resumo, em cada bloco havia  $7 \times 6 = 42$  unidades experimentais. Os brancos foram importantes para aferir o potencial crescimento de algas durante o período de teste, mas também para aferir quaisquer eventuais efeitos do agente tóxico no crescimento de algas. A diminuição na concentração de algas foi monitorizada nas 168 unidades experimentais ( $42 \times 4$  blocos), e a remoção de algas foi quantificada em cada unidade experimental, através de espectrofotometria (Castro *et al.* 2018) ou, no caso do [Chol][DHCit], por contagem de algas no microscópio.

No dia anterior ao início de cada teste, as amêijoas que seriam testadas foram transferidas dos baldes de cultura para recipientes de vidro com cerca de 500 mL de água da torneira desclorinada, após verificar se estavam vivas, uma a uma. As amêijoas foram alimentadas com uma única porção de *R. subcapitata* de  $8 \times 10^4$  células/mL (Bidwell *et al.* 1995) e ficaram privadas de alimento nas 24 h seguintes (até ao início do ensaio). Após este período, os moluscos foram distribuídos aleatoriamente em cada unidade experimental, que consistia numa amêijoas num recipiente de vidro de 200 mL com 100 mL de água da torneira desclorinada. As amêijoas foram mantidas nestas condições, com arejamento constante, durante 1 h, para anular eventuais efeitos da manipulação no início da atividade de filtração.

Após este período de ajuste às condições do teste, foram adicionados os LIs, de modo a obter as concentrações apresentadas na **Tabela 7**. De seguida adicionou-se 2 mL de suspensão de microalgas concentradas a cada frasco de teste, para obter uma densidade celular inicial de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/mL. Depois de adicionar as algas, foi imediatamente retirada uma amostra de cada frasco e medida a sua densidade ótica a 440 nm (espectrofotómetro UV-1800; Shimadzu Corporation, Japão), que representa a densidade celular inicial ( $t_0$ ). Medidas consecutivas de OD440 nm foram realizadas após 30, 60, e 120 min de exposição. O teste é validado se a taxa de filtração após 30 min ( $t_{30}$ ) for superior a 20%. Em todos os testes definitivos esta percentagem foi superada e na maioria das vezes foi mesmo superior a 50%.

**Tabela 7** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes com *C. fluminea* (solução stock =  $6,000 \times 10^4$  mg/L para [Chol]Cl; solução stock =  $2,000 \times 10^4$  mg/L para [Chol][DHCit]; solução stock =  $6,000 \times 10^4$  mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução stock = 500,0 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	2107	323,1	1580	0,8832
2	3161	613,9	2370	1,678
3	4741	1166	3556	3,188
4	7111	2216	5333	6,058
5	$1,067 \times 10^4$	4211	8000	11,51
6	$1,600 \times 10^4$	8000	$1,200 \times 10^4$	21,87

Com base nos dados de densidade celular (células/mL) aos 120 min foi avaliada a taxa de remoção das algas para cada organismo, utilizando o procedimento descrito por Castro e outros autores (2018). A taxa de remoção média obtida em cada bloco foi utilizada para determinação dos valores de EC<sub>50</sub> (4 valores por tratamento).

#### II.2.2.7. Teste de toxicidade em embriões de peixe

O efeito de cada composto no desenvolvimento e mortalidade de peixes foi avaliado utilizando a espécie *Danio rerio*, seguindo a norma OECD 236 (OECD 2013), sendo descrito em detalhe em Oliveira e outros (2009).

Os embriões de *D. rerio* foram obtidos na instalação estabelecida no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (biotério de peixes-zebra). Os adultos são mantidos em água filtrada com carbono complementada com sal marinho “Instant Ocean Synthetic Sea” (Spectrum Brands, EUA), a  $27 \pm 1$  °C e sob um ciclo de luz de 14 h<sup>L</sup>: 10 h<sup>E</sup>, condutividade de  $800 \pm 50$  µS / cm, pH a  $7,5 \pm 0,5$  e oxigénio dissolvido superior a 95% de saturação. Esta água (designada “água do sistema”) foi utilizada como água de diluição na preparação de soluções de teste em todos os ensaios realizados com peixes. Os adultos de *D. rerio* foram alimentados uma vez por dia com dieta artificial comercialmente disponível (ZM 400 Granular, ZM systems, Hampshire, UK).

No ensaio de toxicidade em embriões de peixe (FET) os embriões foram obtidos após cruzamento dos peixes adultos. No **Anexo II.6.2.** apresentam-se os detalhes da preparação do cruzamento (que se realiza no dia anterior ao teste), seleção dos ovos para

teste e montagem do teste. Os ovos de *D. rerio* foram recolhidos imediatamente após acasalamento. Após a recolha, os ovos foram lavados com água do sistema e verificados sob uma lupa (Microscópio de Zoom Estereoscópico - SMZ 1500, Nikon Corporation, Japão). Os ovos que apresentavam irregularidades de clivagem, deformações ou lesões foram descartados.

Os testes foram realizados em microplacas de 24 poços, conforme ilustrado no **Anexo II.6.2.** na **Figura 11**, com um volume total de 2 mL por poço. Os ovos foram expostos a várias concentrações de cada químico (**Tabela 8**), tendo a exposição começado antes das 4 h após a fertilização. Para cada concentração, incluindo o controlo, foram utilizadas vinte réplicas. Adicionalmente, em cada microplaca existiam 4 “controles internos”, equivalentes ao controlo do teste, mas específicos para cada microplaca. Em cada poço foi colocado um embrião, num total de 20 embriões por concentração. As microplacas foram mantidas a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup> (Oliveira *et al.* 2009). A duração da exposição foi de 4 dias.

**Tabela 8** - Gama de concentrações de cada composto usada nos testes com *D. rerio* (solução stock =  $1,000 \times 10^5$  mg/L para [Chol]Cl; solução stock =  $1,000 \times 10^5$  mg/L para [Chol][DHCit]; solução stock =  $1,000 \times 10^5$  mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução stock = 500,0 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl)

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	895,0	62,50	3353	0,4680
2	1701	125,0	5364	4,768
3	3231	250,0	8583	7,629
4	6139	500,0	$1,373 \times 10^4$	12,21
5	$1,166 \times 10^4$	1000	$2,197 \times 10^4$	19,53
6	$2,216 \times 10^4$	2000	$3,516 \times 10^4$	31,25
7	$4,211 \times 10^4$	4000	$5,625 \times 10^4$	50,00
8	$8,000 \times 10^4$	8000	$9,000 \times 10^4$	80,00

No **Anexo II.6.2.** é apresentado o desenho experimental simplificado (**Figura 11**). Os embriões foram observados diariamente (após 24, 48, 72 e 96 h de exposição) sob uma lupa (Microscópio de Zoom Estereoscópico - SMZ 1500, Nikon Corporation, Japão), para registo de malformações e mortalidade. Conforme definido pela norma OECD 236 (OECD 2013), a coagulação de ovos fertilizados, a falta de formação de somitos, a não-separação do cauda-broto do saco vitelino e falta de batimento cardíaco determinaram a avaliação dos

ovos como mortos. Outros critérios tomados como parâmetros complementares foram: atraso na pigmentação ocular e corporal, atraso na absorção do saco vitelino, edemas, deformações da coluna e consequentemente da cauda ou alteração nos batimentos cardíacos com o aumento das concentrações de LI, problemas de equilíbrio, sucesso de eclosão e mortalidade dos embriões pós-eclodidos. Todos os parâmetros foram avaliados de forma qualitativa (observado ou não observado).

## II.2.3. Análise dos dados

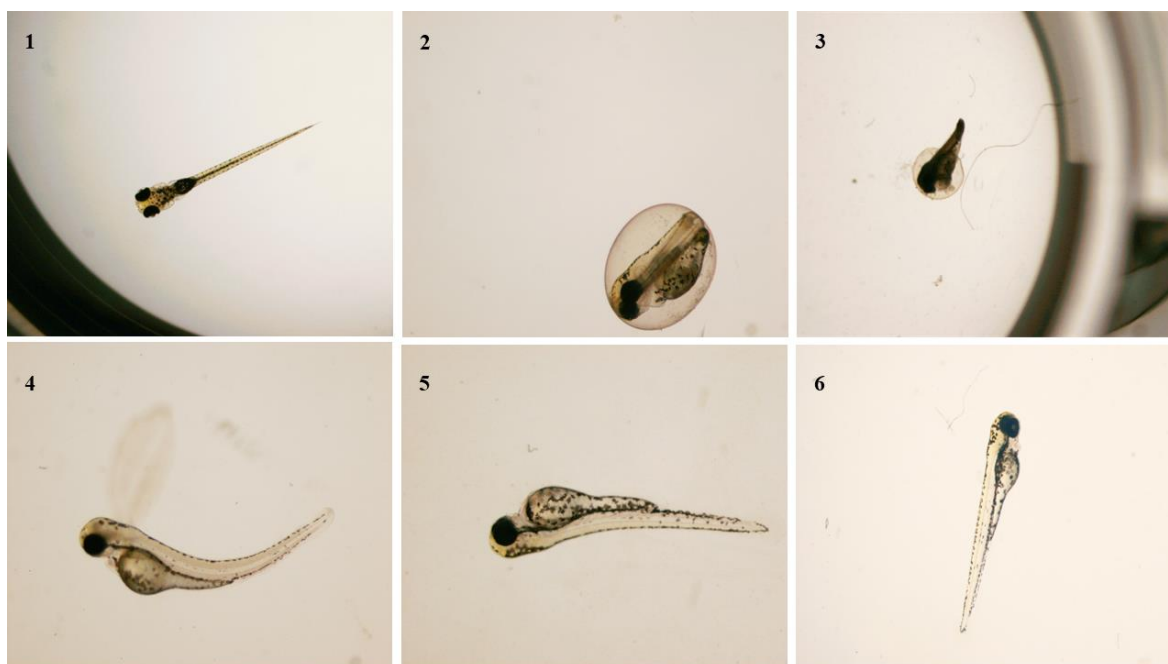
### II.2.3.1. Cálculo dos valores de EC<sub>50</sub>

Os registos obtidos nos bioensaios com as oito espécies seleccionadas (duas microalgas, duas macrófitas, o cladócero, o molusco, o peixe e a bactéria) foram utilizados para estimar concentrações que promovem um efeito de 50%. Na tabela seguinte (**Tabela 9**) apresenta-se a lista de variáveis usadas para calcular o valor de EC<sub>50</sub> para cada espécie e correspondentes intervalos de confiança de 95% para cada LI.

**Tabela 9** - Variáveis usadas para calcular o valor de EC<sub>50</sub> para cada espécie

Espécie (s)	Teste	Variável
<i>A. fischeri</i>	Inibição da bioluminescência	Bioluminescência relativamente ao controlo
<i>R. subcapitata</i> e <i>C. vulgaris</i>	Inibição do crescimento	Incremento no número de células (células/mL)
<i>L. minor</i> e <i>L. gibba</i>	Inibição do crescimento	Incremento no número de folhas; incremento no peso seco
<i>D. magna</i>	Inibição alimentar	Taxa de ingestão (células/ind/h)
<i>C. fluminea</i>	Inibição alimentar	Taxa de ingestão (células/ind/h)
<i>D. rerio</i>	Toxicidade em embriões de peixe	Eclosão ([Chol]Cl; [Chol][DHCit]); edema cardíaco ([Chol]Cl; [Chol][DHCit]); atraso na absorção do saco vitelino ([Chol]Cl; [C <sub>2</sub> mim]Cl; [C <sub>12</sub> mim]Cl); deformação da cauda ([C <sub>2</sub> mim]Cl; [C <sub>12</sub> mim]Cl); problemas no equilíbrio ([Chol][DHCit]), posição lateral ([C <sub>2</sub> mim]Cl; [C <sub>12</sub> mim]Cl).

Na **Figura 8** ilustram-se algumas das deformações que foram identificadas nos ovos ou larvas de peixe zebra expostos aos LIs.



**Figura 8** – Algumas deformações visíveis em ovos ou larvas de *D. rerio* expostos aos LIs: 1) Larva normal (sem deformações) → [Chol]Cl, controlo, dia 5; 2) Ovo, onde é observável atraso na absorção do saco vitelino e edema cardíaco → [C<sub>12</sub>mim]Cl, 1,000×10<sup>5</sup> mg/L, dia 2; 3) Larva morta, em que se pode observar deformação da cauda → [Chol]Cl, 1,000×10<sup>5</sup> mg/L, dia 5; 4) Larva com deformação da cauda, atraso na absorção do saco vitelino e ligeiro edema cardíaco → [C<sub>2</sub>mim]Cl, 1,000×10<sup>5</sup> mg/L, dia 4; 5) Larva com atraso na absorção do saco vitelino e em posição lateral → [Chol]Cl, 1,000×10<sup>5</sup> mg/L, dia 4; 6) Larva com edema cardíaco → [Chol][DHCit], 1,000×10<sup>5</sup> mg/L, dia 4.

O cálculo dos valores de EC<sub>50</sub> foi feito através de uma regressão não linear e utilizando o método dos mínimos quadrados para ajustar os dados à equação logística, usando o programa *STATISTICA Six Sigma* (versão 7, DataMiner1, USA). Além de constituir referências ecotoxicológicas padrão, os dados EC<sub>50</sub> (**Tabela 12** no **Anexo II.6.3.**) foram utilizados para avaliar alterações na toxicidade promovida por variações estruturais nos compostos de colina e imidazólio, utilizando SSDs.



### II.2.3.2. SSDs

A construção de uma SSD envolve três etapas básicas: primeiro é necessário definir e selecionar os dados de concentrações de efeito ( $EC_{50}$ ) para as diferentes espécies quando expostas ao agente de *stress* que vão ser integrados na SSD. Em segundo lugar calcula-se as proporções, começando por ordenar os dados do menor para o maior e, em seguida, converte-se os *ranks* em proporções<sup>12</sup>. Por último tem que se ajustar uma distribuição estatística ou empírica para Proporção (eixo *y*) vs. Intensidade de *stress* (eixo *x*) (Posthuma *et al.* 2002).

Os valores de  $EC_{50}$  obtidos com as oito espécies utilizadas no presente estudo foram utilizados para estimar uma SSD para cada LI e consequentemente valores de  $HC_5$  e  $HC_{50}$  (*Hazard Concentration* que afeta 5% ou 50% das espécies, respetivamente) ao nível do  $EC_{50}$  (porque foi este o nível de efeito definido para selecionar os dados usados para alimentar cada uma das SSD). As SSDs foram estimadas usando o gerador de SSD da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (U S Environmental Protection Agency 2005). O gerador das SSDs é uma ferramenta, construída sobre o *Microsoft Excel*, que ajusta uma distribuição comumente aplicada, o *log-probit* (ou seja, log-normalizado linearizado) aos dados para concentrações nas quais diferentes espécies exibem uma resposta padrão a um *stressor*. As SSDs modelam a variação na sensibilidade de diferentes espécies quando expostas a um *stressor*, e também auxiliam na avaliação de risco relacionando-os à proporção de espécies que se espera que sejam afetadas nas concentrações aplicadas.

### II.3. Resultados e Discussão

Neste estudo abordou-se a toxicidade ambiental de quatro LIs, dois à base do catião colínio e dois tendo o catião imidazólio como base, usando organismos padrão adequados para a triagem dos seus efeitos tóxicos. Por um lado, a forma como as mudanças estruturais influenciam a toxicidade (com base nas estimativas  $EC_{50}$  mais viáveis) foi avaliada e, por outro lado, a consistência nestas relações estrutura-ecotoxicidade entre diferentes sistemas biológicos foi analisada. O principal objetivo foi validar, de uma forma integrada, as regras

---

<sup>12</sup>  $Proporção = (Rank - 0.5) / Number\ of\ Species$

heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs. Estas testaram o efeito da extensão lateral da cadeia alquílica do catião ( $[C_2mim]Cl$  versus  $[C_{12}mim]Cl$ ), o efeito do catião ( $[C_2mim]Cl$  versus  $[Chol]Cl$ ) e o efeito do anião ( $[Chol]Cl$  versus  $[Chol][DHCit]$ ) na toxicidade de LIs para organismos representativos dos ecossistemas aquáticos.

Os valores de  $EC_{50}$  obtidos nos testes realizados, bem como os valores recolhidos da literatura relativos à toxicidade aquática dos LIs estudados, encontram-se na **Tabela 12** no **Anexo II.6.3**. Os valores  $EC_{10}$  e  $EC_{20}$  foram também registados durante este esforço de recolha considerando a sua relevância do ponto de vista ecotoxicológico, pois referem-se a concentrações com reduzido efeito nos organismos, geralmente usadas como referências para a proteção desses mesmos organismos. No entanto, a estimativa do  $EC_{50}$  é intrinsecamente a mais robusta porque é menos suscetível as diferenças na formulação do modelo ajustado; além disso, é mais provável que a sua posição na curva concentração-resposta seja coberta por dados experimentais (Cho *et al.* 2008). Foi este o nível de efeito selecionado para alimentar o modelo que originou cada uma das SSDs construídas. Efetivamente, como o interesse primário deste trabalho era validar as regras heurísticas assumidas para a relação entre a estrutura e a toxicidade de LIs, privilegiou-se a robustez dos dados de entrada em detrimento do seu cariz protetor enquanto referência de toxicidade ambiental.

Os valores de  $EC_{50}$  inferiores a 100 mg/L levantam preocupação acerca dos efeitos dos LIs, pois são considerados nocivos para o meio ambiente, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês: GHS – *Globally Harmonized System, Classification and Labeling of Chemicals*) (GHS 2011). Este sistema, criado pelas Nações Unidas em 2011, uniformiza os critérios para classificar substâncias e compostos em relação aos perigos físicos, para a saúde e para o meio ambiente. Assim, todos os LIs que apresentem valores de  $EC_{50}$  (após exposições curtas, não crónicas) inferiores a 100 mg/L devem ser classificados como nocivos para o ambiente. Todos os LIs estudados apresentam pelo menos um valor de  $EC_{50}$  nestas condições (**Tabela 12** no **Anexo II.6.3**). O  $[C_{12}mim]Cl$  é aquele que levanta maiores preocupações, pois das oito espécies estudadas, seis apresentam valores de  $EC_{50}$  inferiores a 100 mg/L. Em particular, os valores de  $EC_{50}$  para ambas as espécies de algas, por serem inferiores a 1 mg/L, levam a que este LI se enquadre na categoria Agudo 1, ou seja, é declarado como muito tóxico para as espécies aquáticas. Segundo a classificação GHS, o

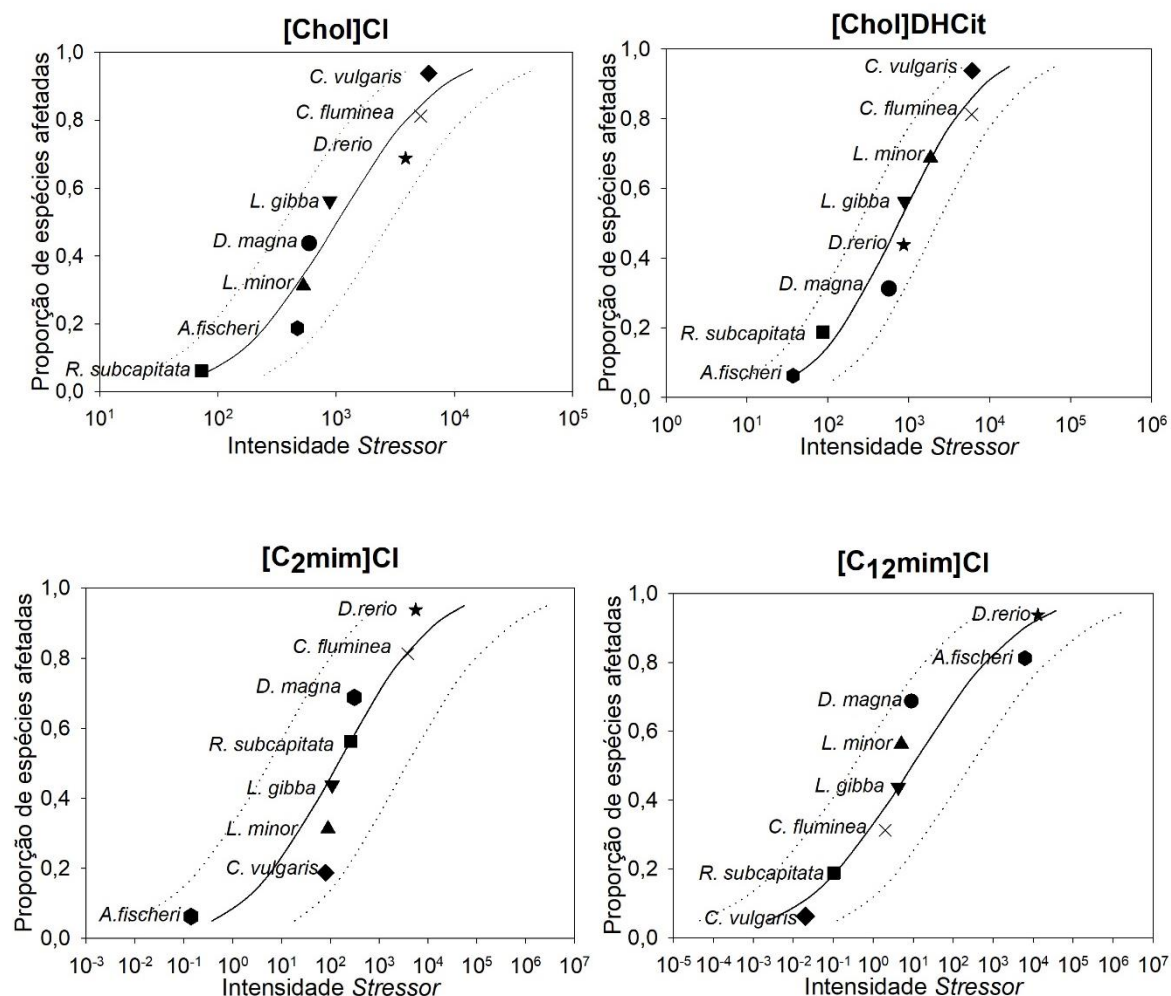
segundo LI mais nocivo é o [C<sub>2</sub>mim]Cl pois para três das espécies (microalga *C. vulgaris* e as duas espécies de macrófitas aquáticas), os valores de EC<sub>50</sub> são inferiores a 100 mg/L e superiores a 10 mg/L, levando a que se enquadre na categoria Agudo 3, ou seja, é nocivo para a vida aquática. Os LIs [Chol]Cl e [Chol][DHCit] enquadram-se também na categoria Agudo 3 por apresentarem o valor de EC<sub>50</sub> para *R. subcapitata* inferior a 100 mg/L. Assim, segundo esta classificação a toxicidade os LIs segue a ordem: [Chol]Cl ≈ [Chol][DHCit] ≤ [C<sub>2</sub>mim]Cl < [C<sub>12</sub>mim]Cl.

A **Figura 9** apresenta as SSDs obtidas para cada LI. As SSDs modelam a variação na sensibilidade das várias espécies quando expostas a cada LI, contribuindo para a obtenção de referências de toxicidade integradas para cada LI que permitem uma validação abrangente das regras heurísticas que se assumem para a ecotoxicidade de LIs.

O efeito do anião na toxicidade dos LIs pode observar-se comparando as curvas de SSD do [Chol]Cl e do [Chol][DHCit], pois estes compostos diferem apenas no anião: cloro (Cl<sup>-</sup>) *versus* dihidrogenocitrato [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub><sup>-</sup>], respetivamente. Verifica-se uma maior amplitude na sensibilidade ao [Chol]Cl do que ao [Chol][DHCit]: os valores de EC<sub>50</sub> de [Chol]Cl variam entre 72,51 para o rendimento de *R. subcapitata* após 96 h de exposição e 1,784×10<sup>4</sup> mg/L para a percentagem de absorção do saco vitelino de *D. rerio* após 5 d de exposição; entre 37,23 para a luminescência de *A. fischeri* após 30 min de exposição e 1863 mg/L para o rendimento de *L. minor* após 7 d de exposição no caso de [Chol][DHCit] (**Tabela 12 no Anexo II.6.3.**). Para ambos os LIs, a espécie menos sensível é *C. vulgaris*, ao passo que a espécie mais sensível é a bactéria no caso do [Chol][DHCit] e a microalga *R. subcapitata* no caso do [Chol]Cl. A diferença relevante de sensibilidade entre microalgas verdes de espécies diferentes já tem sido observada em outros estudos com diferentes contaminantes, por exemplo metais e pesticidas (Fairchild *et al.* 1998; Pereira *et al.* 2005). No entanto, o diferencial de sensibilidade reportado não é tão expressivo como o encontrado no presente trabalho para a [Chol][DHCit], onde o valor de EC<sub>50</sub> obtido para *R. subcapitata* é praticamente uma ordem de grandeza mais baixo do que o que foi obtido com *C. vulgaris* (**Tabela 12 no Anexo II.6.3.**). Assim, sugere-se que esta variação de sensibilidade poderá estar relacionada com o modo específico de indução de toxicidade da [Chol][DHCit]. No teste realizado com *C. vulgaris* exposta ao LI [Chol][DHCit] foi observada claramente uma alteração da forma destas microalgas e foi notória a sua descoloração, sem que houvesse uma correspondente diminuição do número (variável que

é efetivamente registrada para a determinação do EC<sub>50</sub> que alimenta a SSD). Estas particularidades, que não foram observadas na outra espécie de microalgas testada, deverão ter conduzido ao posicionamento de *C. vulgaris* como a espécie mais tolerante na SSD correspondente. Estes resultados poderão ser potencialmente explicados pela diferença na estrutura e forma da célula de cada microalga, mas este será um fenómeno a ser estudado em maior detalhe em futuros trabalhos. As duas espécies de algas de água doce aqui estudadas podem diferir na sua capacidade de acumular contaminantes. Estas diferenças podem ser devidas a características morfológicas e fisiológicas específicas das células, tais como o conteúdo lipídico, e a estrutura e composição das paredes celulares. Além disso, diferenças no tamanho implicam diferenças na relação superfície-volume, o que naturalmente influencia a internalização de compostos químicos. Por exemplo, as espécies que possuem um tamanho celular menor têm tendência para acumular quantidades mais elevadas de pesticidas em relação às espécies maiores (Tang *et al.* 2009). Globalmente, as SSD mostram de forma consistente que a alteração do anião se traduz numa alteração na distribuição da sensibilidade de espécies, corroborando conclusões anteriores (Santos *et al.* 2015), e novamente reforçando a necessidade de analisar relações de estrutura-toxicidade com base em valores de referência de toxicidade integrados e não considerando organismos selecionados individualmente.

Quanto ao efeito do catião, este pode observar-se comparando as curvas de SSD do [C<sub>2</sub>mim]Cl e [Chol]Cl, pois estes compostos diferem apenas no catião: 1-etil-3-metilimidazólio *versus* colina, respetivamente. Verifica-se uma maior amplitude na sensibilidade ao [C<sub>2</sub>mim]Cl do que ao [Chol]Cl, com valores de EC<sub>50</sub> entre 0,1409 (luminescência de *A. fischeri* após 30 min) e 1,476×10<sup>4</sup> mg/L (deformação da cauda de *D. rerio* após 5 d de exposição) para [C<sub>2</sub>mim]Cl; 72,51 (rendimento de *R. subcapitata* após 96 h de exposição) e 17835 mg/L (percentagem de absorção do saco vitelino *D. rerio* após 5 d de exposição) para [Chol]Cl (**Tabela 12** no **Anexo II.6.3.**). A espécie menos sensível ao [Chol]Cl é a microalga *C. vulgaris*, no caso do [C<sub>2</sub>mim]Cl é o peixe. Quanto às espécies mais sensíveis são a bactéria no caso do [C<sub>2</sub>mim]Cl e a microalga *R. subcapitata* ao [Chol]Cl.



**Figura 9** – Distribuições de sensibilidade (SSD) considerando as várias espécies para as quais foram recolhidos ou determinados valores de  $EC_{50}$ , relativos aos quatro LIs selecionados para o presente estudo.

Para avaliar o efeito do tamanho da cadeia alquílica na toxicidade dos LIs deve comparar-se as curvas de SSD do  $[C_2mim]Cl$  e  $[C_{12}mim]Cl$ , pois estes compostos diferem apenas no comprimento da cadeia alquílica do catião: radical etil *versus* radical dodecil, respetivamente. Verifica-se uma maior amplitude na sensibilidade ao  $[C_{12}mim]Cl$  do que ao  $[C_2mim]Cl$ , com valores de  $EC_{50}$  entre 0,0202 (rendimento de *C. vulgaris* após 96 h de exposição) e  $1,811 \times 10^4$  mg/L (deformação da cauda de *D. rerio* após 5 d de exposição) para  $[C_{12}mim]Cl$  e entre 0,1409 (luminescência de *A. fischeri* após 30 min de exposição) e 14761 mg/L (deformação da cauda de *D. rerio* após 5 d) para  $[C_2mim]Cl$  (**Tabela 12** no **Anexo II.6.3.**). Para ambos os LIs, a espécie menos sensível é *D. rerio*, ao passo que a

espécie mais sensível é a bactéria no caso do [C<sub>2</sub>mim]Cl e a microalga *C. vulgaris* no caso do [C<sub>12</sub>mim]Cl.

Na **Tabela 10** são apresentados os valores de HC<sub>5</sub> e HC<sub>50</sub> (concentração a que 5% e 50% das espécies representativas da comunidade são afetadas, respetivamente) para cada um dos LIs. Por exemplo, no caso do LI [C<sub>12</sub>mim]Cl para concentrações superiores a 0,002421 mg/L mais de 5% da comunidade aquática será afetada. Observa-se uma ampla variação nos valores de HC<sub>5</sub>, sendo superior a 4 ordens de grandeza dependendo dos LIs comparados. A variação da toxicidade, considerando o HC<sub>5</sub> como referência confirma a ordenação discutida acima, sendo [C<sub>12</sub>mim]Cl o LI mais tóxico e [Chol][DHCit] e [Chol]Cl os menos tóxicos. Nos valores de HC<sub>50</sub> é observável um aumento considerável da concentração (9,507 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl, 3 ordens de grandeza acima do HC<sub>5</sub> correspondente) à qual 50% da comunidade aquática sofre perturbações, o que é consistente com a amplitude geralmente grande da sensibilidade das diferentes espécies aos LIs. No caso dos valores de HC<sub>50</sub> não se nota tanta amplitude na variação do HC<sub>5</sub> entre LIs. No entanto a tendência geral mantém-se, sendo [C<sub>12</sub>mim]Cl o LI mais tóxico e [Chol][DHCit] e [Chol]Cl os menos tóxicos. A toxicidade relativa dos LIs está provavelmente associada à variação da lipofilicidade dos compostos. A lipofilicidade de um composto é uma medida da sua maior afinidade para com sistemas mais orgânicos, mais apolares, a qual pode ser expressa em função dos valores do coeficiente de partição octanol/água, expresso como K<sub>OW</sub>. Uma vez que o valor de K<sub>OW</sub> apresenta uma ampla gama de variação (várias ordens de grandeza), utiliza-se o logaritmo de K<sub>OW</sub> (log K<sub>OW</sub>, também designado log P) (Cumming e Rü 2017). Quanto menor o valor de log K<sub>OW</sub>, mais hidrofílico é o composto, ou seja, menor a sua afinidade para os sistemas orgânicos e maior para a fase aquosa.

**Tabela 10** – Valores de HC<sub>5</sub> e HC<sub>50</sub> com o respetivo intervalo de confiança (*lower PI-upper PI*) e do coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>)

LIs	HC <sub>5</sub> ; lower PI – upper PI (mg/L)	HC <sub>50</sub> ; lower PI – upper PI (mg/L)	r <sup>2</sup>
[Chol]Cl	73,00 (21,63 – 246,4)	1015 (361,4 – 2853)	0,9136
[Chol][DHCit]	31,89 (8,684 – 117,1)	746,6 (246,7 – 2260)	0,9308
[C <sub>2</sub> mim]Cl	0,3797 (7,679×10 <sup>-3</sup> – 18,77)	145,3 (5,535 – 3812)	0,8306
[C <sub>12</sub> mim]Cl	2,421×10 <sup>-3</sup> (4,612×10 <sup>-5</sup> - 0,1270)	9,507 (0,3302 – 273,7)	0,9075

Na **Tabela 11** são apresentados os valores de log K<sub>ow</sub> para os LIs estudados. O LI [C<sub>12</sub>mim]Cl, por apresentar o maior valor de log K<sub>ow</sub> é, o mais hidrofóbico *i.e.*, aquele com menor afinidade para sistemas aquosos e, portanto, com maior preferência pela fase orgânica. Quanto maior a partição para a fase orgânica, maior a sua tendência para adsorver às membranas ou paredes celulares e também maior a facilidade com que o composto atravessa as membranas celulares, o que explica a sua maior toxicidade (Ventura *et al.* 2011). Em relação aos restantes LIs, apesar da variação do log K<sub>ow</sub> ser menor, está de acordo com o esperado: LIs com menor log K<sub>ow</sub> são menos tóxicos.

**Tabela 11** - Valores de log K<sub>ow</sub> dos LIs estudados. Fontes: (web: <http://www.molbase.com/>) para [Chol][DHCit], [C<sub>2</sub>mim]Cl, [C<sub>12</sub>mim]Cl, e [Chol]Cl (web: <http://www.molbase.com/>), acedido em: 17/11/2018

LIs	log K <sub>ow</sub>
[Chol]Cl	-3,311
[Chol][DHCit]	-2,9898
[C <sub>2</sub> mim]Cl	-2,6635
[C <sub>12</sub> mim]Cl	1,2375

O facto da variação do anião ter efeito reduzido na toxicidade de LIs à base de colina está de acordo com o reportado em artigos anteriores, desde estudos com *A. fischeri* (Ranke *et al.* 2004), estendendo-se até organismos multicelulares, nomeadamente *Daphnia magna* (Bernot *et al.* 2005). O mesmo se observou para a variação do anião em LIs à base de imidazólio (Docherty e Kulpa, Jr. 2005).

No que diz respeito ao efeito do catião, observou-se um aumento de toxicidade com o aumento de tamanho e complexidade do catião. De facto, o catião colina mostrou-se menos tóxico que o catião 1-etil-3-metilimidazólio, uma vez que o catião colina apresenta uma maior hidrofiliidade pela presença do grupo hidroxilo, significando que terá uma menor afinidade para interagir com a estrutura mais hidrofóbica dos organismos. Esta tendência (aumento de toxicidade com a diminuição da hidrofiliidade do catião) está de acordo com conclusões anteriores por outros autores (Huddleston *et al.* 2001; Ventura *et*

*al.* 2013) e deve-se, provavelmente, ao aumento da hidrofobicidade da molécula (Thuy Pham *et al.* 2010). De facto, o [C<sub>2</sub>mim]Cl detém um log K<sub>OW</sub> ligeiramente inferior ao do [Chol]Cl (**Tabela 11**), o que apoia esta interpretação.

A extensão da cadeia alquílica do catião refletiu-se no aumento da toxicidade, o que corrobora resultados anteriores (Docherty e Kulpa, Jr. 2005; Santos *et al.* 2015). Neste sentido, um aumento no comprimento da cadeia do grupo alquilo, bem como um aumento no número de grupos alquilo substituídos no anel catiónico, conduz a um aumento na toxicidade (Santos *et al.* 2015). Esta maior toxicidade está provavelmente associada com a maior hidrofobicidade do composto, conforme referido anteriormente. Em particular, uma maior toxicidade do [C<sub>12</sub>mim]Cl, comparando com o [C<sub>2</sub>mim]Cl, foi efetivamente observada para *A. fischeri* e corroborada pelos valores de log K<sub>OW</sub> (Ventura *et al.* 2012). Esta tendência (aumento da toxicidade com o aumento da cadeia alquílica do catião), válida para LIs à base de imidazólio não é, no entanto, válida para todos os LIs, como é exemplo os LIs à base de guanidínio (Ventura *et al.* 2012).

O facto de alguns LIs, nomeadamente o [C<sub>12</sub>mim]Cl, apresentarem uma elevada toxicidade, levanta uma preocupação ambiental pois é possível observar efeitos deste LI na comunidade aquática para concentrações na ordem das µg/L. Note-se que o valor de HC<sub>5</sub> para este LI é de 0,002421 mg/L. Apesar da sensibilidade das espécies ser variável verifica-se, que os organismos selecionados para este trabalho o foram com a preocupação de abranger diferentes níveis funcionais dos ecossistemas aquáticos e representar os diversos níveis principais nas teias alimentares aquáticas. Assim, ainda que só uma das espécies incluídas no estudo possa ser fortemente afetada, esta será sempre uma indicação preocupante relativamente ao risco que o LI em causa pode representar para os ecossistemas aquáticos. Por exemplo, tendo em conta que *R. subcapitata* e *C. vulgaris* são as espécies mais sensíveis a este LI (**Figura 9**), pode assumir-se que o fitoplâncton, que constitui a base (produtores) das teias tróficas aquáticas, será fortemente afetado a baixíssimas concentrações de [C<sub>12</sub>mim]Cl. Se este nível trófico e funcional for afetado, indiretamente ocorrem efeitos deletérios ao nível dos consumidores primários (*e.g.* zooplâncton), resultantes da diminuição da disponibilidade e/ou qualidade de alimento.

A elevada toxicidade do [C<sub>12</sub>mim]Cl para 2 das 8 espécies estudadas, com valores de EC<sub>50</sub> inferiores a 1 mg/L, contraria o proclamado carácter verde dos LIs e sublinha a importância de avaliar a toxicidade dos LIs para uma grande variedade de organismos, de



modo a obter curvas de distribuição de sensibilidades das espécies aquáticas e, desta forma, estabelecer limites máximos de concentração para proteção dos ecossistemas aquáticos.

#### II.4. Conclusão

Os LIs têm sido divulgados como solventes verdes, no entanto a sua toxicidade pode ser bastante elevada, como se verificou ser o caso do  $[C_{12}mim]Cl$ . A abordagem utilizada neste trabalho para avaliar a ecotoxicidade de vários LIs (SSD) incluiu várias espécies representativas das comunidades aquáticas sendo, portanto, mais relevante do ponto de vista ambiental (Brix *et al.* 2001). Esta abordagem integradora permite estabelecer relações entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade, devendo ser estendida a outros LIs, confrontando variáveis estruturais (nº e carbonos das cadeias alquílicas) e/ou propriedades delas derivadas (*e.g.* Kow) com os valores de  $HC_5$  ou  $HC_{50}$  derivados das SSD, particularmente quando não há consistência entre as respostas dadas pelos diferentes sistemas biológicos testados, o que foi de facto verificado no presente estudo.

Este trabalho permitiu validar as regras heurísticas associadas ao efeito da variação do anião, do catião e do comprimento da cadeia alquílica do catião, na toxicidade dos LIs, utilizando uma abordagem integradora da sensibilidade de diferentes espécies. A toxicidade dos LIs varia de acordo com a seguinte ordem:  $[Chol]Cl \approx [Chol][DHCit] \leq [C_2mim]Cl < [C_{12}mim]Cl$ . O facto dos valores de  $HC_5$  e  $HC_{50}$  para o  $[C_{12}mim]Cl$  serem relativamente baixos (0,002421 mg/L - 9,507 mg/L) respetivamente, levanta preocupações acerca dos efeitos deste LI para as comunidades aquáticas, o que poderá ser válido para outros LIs. Esta abordagem integradora permite de facto estabelecer relações entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade, que facilitam a previsão dos potenciais efeitos ambientais, dispensando ou reduzindo a necessidade de avaliar todos os LIs experimentalmente. Como observação final, vale a pena sugerir a continuação de estudos integrativos para melhor caracterizar o potencial de risco ambiental da família dos LIs estudados neste trabalho, assim como de outros LIs representativos de outras famílias, que ainda não se encontram caracterizados desta forma.

## II.5. Referências bibliográficas

- Allen Y, Calow P, Baird DJ (1995) A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 14:1625–1630. doi: 10.1002/etc.5620140923
- American Society for Testing and Materials (1980) Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Calow P, Soares AMVM (1989) The *Daphnia* bioassay: a critique. Hydrobiologia 188–189:403–406. doi: 10.1007/BF00027806
- Beadham I, Gurbisz M., Gathergood N. (2012) Handbook of green chemistry. Designing safer chemicals. Wiley-VCH, Weinheim
- Bernot RJ, Brueseke MA, Evans-White MA, Lamberti GA (2005) Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 24:87–92. doi: 10.1897/03-635.1
- Bidwell JR, Farris JL, Cherryb S (1995) AljUAIIIC. 33:183–200
- Brix K V., DeForest DK, Adams WJ (2001) Assessing acute and chronic copper risks to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups. Environ Toxicol Chem 20:1846–1856. doi: 10.1002/etc.5620200831
- Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F, Pereira JL (2018) Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. Aquat Toxicol 196:25–34. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.01.002
- Chen H, Wen Y, Waters MD, Shonnard DR (2002) Design Guidance for Chemical Processes Using Environmental and Economic Assessments. Ind Eng Chem Res 41:4503–4513. doi: 10.1021/ie010835y
- Cho C-W, Phuong Thuy Pham T, Jeon Y-C, Yun Y-S (2008) Influence of anions on the toxic effects of ionic liquids to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*. Green Chem 10:67–72. doi: 10.1039/B705520J
- Cumming H, Rü C (2017) Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple <sup>1</sup>H NMR Method. ACS Omega 2: 6244–6249 doi: 10.1021/acsomega.7b01102
- Deetlefs M, Oggi KS-C, 2006 (2006) Ionic liquids: fact and fiction. Teknoscienze
- Docherty KM, Kulpa, Jr. CF (2005) Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. Green Chem 7:185-189. doi: 10.1039/b419172b

- Earle MJ, Esperança JMSS, Gilea MA, Lopes JNC, Rebelo LPN, Magee JW, Seddon KR Widegren JA (2006) The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 439:831–834. doi: 10.1038/nature04451
- Elendt B-P, Bias W-R (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res* 24:1157–1167. doi: 10.1016/0043-1354(90)90180-E
- Fairchild, Ruessler DS, Carlson AR (1998) Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ Toxicol Chem* 17:1830–1834. doi: 10.1002/etc.5620170924
- Freire MG, Claudio AFM, Araujo JMM, Coutinho JAP, Marrucho IM, Lopes JNC, Rebelo LPauloN (2012) Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Rev* 41:4966–4995. doi: 10.1039/C2CS35151J
- GHS (2011) Globally Harmonized system of Classification and Labelling of Chemicals, United Nations
- Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD (2001) Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem* 3:156–164. doi: 10.1039/b103275p
- Janet R, Stein E, Stein J (1973) *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*
- Johnson BT (2005) Microtox® Acute Toxicity Test. In: *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 69–105
- Knoben RA., Beek M., Durand A. (1998) Application of species sensitivity distributions as ecological risk assessment tool for water management. *J Hazard Mater* 61:203–207. doi: 10.1016/S0304-3894(98)00124-1
- Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13:565–571. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00353-1
- Kulacki KJ, Lamberti GA (2008) Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. *Green Chem* 10:104–110. doi: 10.1039/B709289J
- Latała A, Nędzi M, Stepnowski P (2009) Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina* (green algae) and

- Cyclotella meneghiniana, Skeletonema marinoi (diatoms). Green Chem 11:580-588. doi: 10.1039/b821140j
- Lovelock KRJ, Deyko A, Licence P, Jones RG (2010) Vaporisation of an ionic liquid near room temperature. Phys Chem Chem Phys 12:8893-8901. doi: 10.1039/c004197a
- McWilliam RA, Baird DJ (2002a) Application of postexposure feeding depression bioassays with *Daphnia magna* for assessment of toxic effluents in rivers. Environ Toxicol Chem 21:1462–1468. doi: 10.1002/etc.5620210718
- McWilliam RA, Baird DJ (2002b) Postexposure feeding depression: A new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 21:1198–1205. doi: 10.1002/etc.5620210612
- OECD 201 (2015) Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development. 1-25. doi: 10.1787/20745761
- OECD 202 (2006) Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development. 1–22. doi: 10.1787/9789264016194-en
- OECD 236 (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organization for Economic Cooperation and Development. 1–22. doi: 10.1787/20745761
- Oliveira R, Domingues I, Grisolia CK, M. AM V. (2009) Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. Environ Sci Pollut Res. 16:679–688. doi: 10.1007/s11356-009-0119-3
- Pereira, Resende P, Azeiteiro UM, Oliveira J, de Figueiredo DR (2005) Differences in the Effects of Metals on Growth of Two Freshwater Green Algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectorale* Müller). Bull Environ Contam Toxicol 75:515–522. doi: 10.1007/s00128-005-0782-0
- Pham TPT, Cho C-W, Min J, Yun Y-S (2008) Alkyl-chain length effects of imidazolium and pyridinium ionic liquids on photosynthetic response of *Pseudokirchneriella subcapitata*. J Biosci Bioeng 105:425–428. doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.105.425>
- Plechko N V., Seddon KR (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. Chem Soc Rev 37:123–150. doi: 10.1039/B006677J
- Posthuma L, Suter GW, Traas TP (2002) Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis Publishers. 1: 587. doi: 9781420/032314
- Pretti C, Chiappe C, Baldetti I, Brunini S, Monni G, Intorre L (2009) Acute toxicity of

- ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1170–1176. doi: 10.1016/J.ECOENV.2008.09.010
- Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczbott J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 58:396–404. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00105-2
- Rosa IC, Pereira JL, Costa R, Gomes J, de Lourdes Pereira M, Gonçalves F (2014) Dispersal of *Corbicula fluminea*: factors influencing the invasive clam's drifting behavior. *Ann Limnol - Int J Limnol* 50:37–47. doi: 10.1051/limn/2013069
- Samorì C, Pasteris A, Galletti P, Tagliavini E (2007) Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 26:2379–2382. doi: 10.1897/07-066R2.1
- Santos JJ, Gonçalves AMM, Pereira JL, Figueiredo BFHT, e Silva FA, Coutinho JAP, Ventura SPM, Gonçalves F (2015) Environmental safety of cholinium-based ionic liquids: assessing structure–ecotoxicity relationships. *Green Chem* 17:4657–4668. doi: 10.1039/C5GC01129A
- Silva FA e, Siopa F, Figueiredo BFHT, Gonçalves AMM, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP, Afonso CAM, Ventura SPM (2014) Sustainable design for environment-friendly mono and dicationic cholinium-based ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf* 108:302–310. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.07.003
- Tang J, Hoagland KD, Siegfried BD (2009) Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ Toxicol Chem* 17:1085–1090. doi: 10.1002/etc.5620170614
- Thuy Pham TP, Cho CW, Yun YS (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res* 44:352–372. doi: 10.1016/j.watres.2009.09.030
- Tundo P, Perosa A, Zecchini F (2007) Methods and reagents for green chemistry: an introduction. Wiley-Interscience. pp – 357. doi: 04701/24075
- National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. (2005) Methods / Indicators for Determining when Metals are the Cause of Biological Impairments of Rivers and Streams: Species Sensitivity Distributions and Chronic

- Exposure-Response Relationships from Laboratory Data. Washington, DC. Environmental Protection Agency (EPA) 1-39
- Van der Hoeven N (2001) Estimating the 5-Percentile of the Species Sensitivity Distributions Without Any Assumptions about the Distribution. *Ecotoxicology* 10:25–34. doi: 10.1023/A:1008998405241
- Van Rantwijk F, Lau RM, Sheldon RA (2003) Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol* 21:131–138. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00008-8
- van Rantwijk F, Sheldon RA (2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev* 107:2757–2785. doi: 10.1021/cr050946x
- Ventura SPM, e Silva FA, Gonçalves AMM, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP (2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 102:48–54. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.003
- Ventura SPM, Gonçalves AMM, Sintra T, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP (2013) Designing ionic liquids: The chemical structure role in the toxicity. *Ecotoxicology* 22:1–12. doi: 10.1007/s10646-012-0997-x
- Ventura SPMM, Gardas RL, Gonçalves F, Coutinho JAPP (2011) Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: Octanol-water distribution coefficients and toxicological data. *J Chem Technol Biotechnol* 86:957–963. doi: 10.1002/jctb.2606
- Ventura SPMM, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CAMM, Gonçalves F, Coutinho JAPP (2012) Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 76:162–168. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.10.006
- Wasserscheid P, Welton T (Thomas) (2007) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH. pp – 749. doi: 35276/21202

## II.6. Anexos

### Anexo II.6.1. Contagem de microalgas

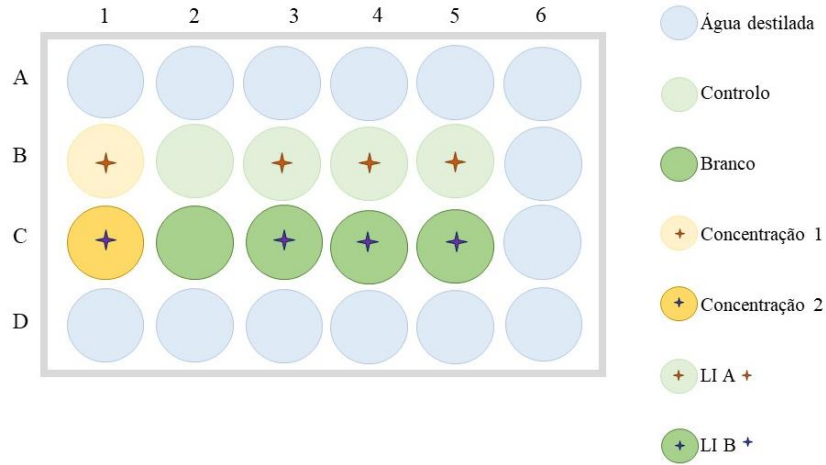
Antes de iniciar a contagem, é fundamental verificar se a câmara está bem limpa e seca. A lavagem deve ser feita passando a câmara e a lamela<sup>13</sup> respectiva por água destilada, secando bem com papel absorvente. É necessário cuidado ao rodar o revólver do microscópio para a ampliação desejada, pois a câmara é mais espessa que as lâminas típicas de observação microscópica. É recomendável utilizar a ampliação ocular de 10 x e objetiva de 40 x. Relativamente ao carregamento da câmara de Neubauer, começa-se por colocar a lamela na câmara (cobrindo as duas grelhas de contagem). Com uma pipeta (*e.g.* micropipeta) introduz-se a suspensão pipetada entre a lâmina e a lamela até preencher completamente a grelha do lado em que se pipetou. A colocação da câmara na platina do microscópio deve ser antecedida de um período de repouso da câmara (cerca de 5 min), que permite que as algas sedimentem ( $\approx 5$  min), facilitando a visualização de todas no mesmo plano de focagem.

As contagens expressam-se em número de células (algas unicelulares) por unidade de volume. Se a suspensão de células a contar for muito concentrada, deve fazer-se uma diluição prévia (*e.g.* 1:10) em meio de cultura, para que a sobreposição de células na câmara não dificulte/impossibilite a contagem. A contagem normalmente centra-se na inspeção do quadrado central de cada grelha da câmara e o nº de células contadas é convertido em densidade celular da amostra tendo em conta a carga volumétrica da câmara de Neubauer usada. Sabendo que a norma utilizada como referência para os ensaios de toxicidade com microalgas requer que o teste seja iniciado com uma concentração de  $10^4$  células/mL, procede-se ao ajuste do inóculo de forma a que o volume adicionado a cada réplica permita estabelecer essa densidade celular inicial. Posteriormente carregam-se as microplacas, sendo que cada microplaca tem 24 poços (4 linhas A-D e 6 colunas 1-6), em ambiente estéril (junto da chama) com 1000  $\mu$ L de água destilada nos poços indicados a azul na **Figura 10** para ajudar a minimizar a evaporação durante o tempo de exposição. De seguida pipeta-se o respetivo volume de LI e MBL de acordo com a gama de concentrações pretendidas nos brancos e tratamentos com as respetivas réplicas (colunas 3,

---

<sup>13</sup> A lamela da Câmara de Neubauer não é uma lamela normal, é mais espessa e mais pesada do que as lamelas normais utilizadas em microscopia ótica. A substituição da lamela da câmara por uma normal implica erro nas contagens por mau funcionamento da câmara.

4 e 5, linhas B e C). Completa-se cada poço com o volume de MBL e de inóculo de algas necessário até perfazer 1000  $\mu\text{L}$ .



**Figura 10** - Microplaca de contagem de microalgas

Quanto à determinação da densidade celular no final dos ensaios deve ser feita uma vez para cada amostra, ou seja, é feita uma leitura para cada réplica de cada tratamento (3 réplicas por tratamento = 3 contagens por tratamento) estabelecido no ensaio, em câmara de Neubauer.



### **Anexo II.6.2. Cruzamentos de *D. rerio***

Para realizar o cruzamento é necessário cumprir o procedimento experimental aconselhado pelo laboratório em causa. A sala de cultivo é equipada com 2 sistemas de suporte de vida independentes: sistema novo, constituído pelo *rack* de crescimento onde estão as larvas e juvenis e o *rack* de cruzamento onde se encontram os peixes em idade fértil; sistema velho, local no qual se encontram os peixes que já não se reproduzem e os peixes que estão em quarentena.

Em geral, os cruzamentos devem decorrer em aquários distintos dos aquários de cultura. Para tal, na véspera do teste colocamos berlines de vidro no fundo de um aquário para cruzamento, e transferimos para o mesmo todos os peixes de um aquário de cultura pré-selecionado. Logo de seguida os aquários de cruzamento são devolvidos ao sistema de fluxo contínuo (*rack* de cruzamento). No dia seguinte, por volta das 9 h 15 min/9 h 30 min, retiram-se os aquários de cruzamento do sistema, e colocam-se sobre a bancada. Os peixes são mantidos nestas condições até às 10 h 30 min/11 h, neste período, é esperado que as fêmeas ponham ovos, os quais são fertilizados pelos machos. Os berlines são usados para prevenir que os peixes prendem os ovos. Após este período, os peixes são retirados para um aquário mais pequeno e posteriormente, transferidos para um aquário de cultura lavado, e devolvidos ao *rack* de cruzamento. Os berlines são removidos com um crivo, para garantir que os ovos ficam no fundo do aquário. Posteriormente os ovos são coados, lavados e separados para placas de petri (+/- 100 por placa) - esta separação é feita a olho nu, sobre um fundo preto para facilitar a observação dos ovos. De seguida, procede-se a uma seleção mais minuciosa dos ovos, utilizamos a lupa (Stereoscopic Zoom Microscope-SMZ 1500, Nikon Corporation). Os ovos não fertilizados, bem como ovo com deformações/danos ou atraso no desenvolvimento são removidos e posteriormente congelados, não sendo utilizados nos ensaios. Apenas os ovos que apresentam um desenvolvimento normal e sem deformações são utilizados nos ensaios. Os testes são realizados em placas de 24 poços, com um ovo em cada poço. Em cada microplaca são expostos 20 ovos a um determinado tratamento, existindo também, 4 ovos que servem de controlo interno, tal como se ilustra na **Figura 11**.

C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>0</sub>
C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>0</sub>
C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>0</sub>
C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>0</sub>

**Figura 11** - Desenho experimental FET para a concentração C<sub>1</sub> (parte esquerda da placa); a coluna à direita corresponde ao controlo interno (ou controlo da placa); são utilizadas outras placas, com distribuição de tratamentos semelhante, para as restantes concentrações, incluindo o controlo.

### Anexo II.6.3. Valores de EC<sub>50</sub>

**Tabela 12** – Valores de EC<sub>50</sub> para todos os parâmetros e espécies que foram recolhidos na pesquisa e que foram obtidos no presente estudo para a construção das SSD. Os valores efetivamente usados estão sombreados a cinza.

LIs	Espécies	Período de exposição	Parâmetros	Valor EC <sub>50</sub> (mg/L)	EC <sub>50</sub> 95%CI (mg/L)	Referências	Notas
[Chol]Cl	<i>Aliivibrio fischeri</i>	30min	Luminescência	469,3	383.76-554.91	Ventura <i>et al.</i> 2014	
[Chol]Cl	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h	Rendimento	72,51	52.14-92.88	Santos <i>et al.</i> 2015	
[Chol]Cl	<i>Chlorella vulgaris</i>	96h	Rendimento	6054	5332-6775	Presente estudo	
[Chol]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	234,2	154.0-314.5	Santos <i>et al.</i> 2015	nº frondes
[Chol]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	1185	415.5-1955	Santos <i>et al.</i> 2015	peso seco
[Chol]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	487	441-533	Presente estudo	nº frondes
[Chol]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	1599	830-2369	Presente estudo	peso seco
[Chol]Cl	<i>Daphnia magna</i>	24h+4h	Inibição Alimentar - pós exposição	590	488-692	Presente estudo	
[Chol]Cl	<i>Corbicula fluminea</i>	2h	Inibição Alimentar	5181	4205-6156	Presente estudo	
[Chol]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Eclosão	1169	669-1668	Presente estudo	
[Chol]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Absorção do saco vitelino (%)	17835	16302-19368	Presente estudo	
[Chol]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Edema cardíaco (%)	2759	1173-4346	Presente estudo	
[Chol][DHCit]	<i>Aliivibrio fischeri</i>	30min	Luminescência	37,23	28.60-45.85	Ventura <i>et al.</i> 2014	
[Chol][DHCit]	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h	Rendimento	87,16	80.62-93.70	Santos <i>et al.</i> 2015	
[Chol][DHCit]	<i>Chlorella vulgaris</i>	96h	Rendimento	524,0	400-648	Presente estudo	
[Chol][DHCit]	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	1863	1007-2720	Santos <i>et al.</i> 2015	nº frondes
[Chol][DHCit]	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	880,9	667-1095	Presente estudo	nº frondes
[Chol][DHCit]	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	1631	756-2506	Presente estudo	peso seco
[Chol][DHCit]	<i>Daphnia magna</i>	24h+4h	Inibição Alimentar - pós exposição	570,0	494-646	Presente estudo	
[Chol][DHCit]	<i>Danio rerio</i>	5d	Eclosão	1411	1366-1456	Presente estudo	
[Chol][DHCit]	<i>Danio rerio</i>	5d	Equilíbrio (%)	326,4	83-570	Presente estudo	
[Chol][DHCit]	<i>Danio rerio</i>	5d	Edema cardíaco (%)	1411	1366-1456	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Aliivibrio fischeri</i>	30min	Luminescência	0,1409	0.1376-0.1443	Presente estudo	

LIs	Espécies	Período de exposição	Parâmetros	Valor EC <sub>50</sub> (mg/L)	EC <sub>50</sub> 95%CI (mg/L)	Referências	Notas
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h	Rendimento	265,2	162-369	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Chlorella vulgaris</i>	96h	Rendimento	79,72	66-94	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	63,34	57-69	Presente estudo	nº frondes
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	127,7	76-180	Presente estudo	peso seco
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	51,26	44-58	Presente estudo	nº frondes
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	232,8	83-382	Presente estudo	peso seco
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Daphnia magna</i>	24h+4h	Inibição Alimentar - pós exposição	310,9	279-342	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Corbicula fluminea</i>	2h	Inibição Alimentar	3886	3154-4617	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Absorção do saco vitelino(%)	1009	9567-10451	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Defeito na cauda (%)	14761	14622-14899	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Problema de equilíbrio (%)	6162	5336-6989	Presente estudo	
[C <sub>2</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Posição lateral (%)	1,0899×10 <sup>4</sup>	9207-12591	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Aliivibrio fischeri</i>	30min	Luminescência	6270	5286-7254	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h	Rendimento	0,1028	0.0766-0.1291	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Chlorella vulgaris</i>	96h	Rendimento	0,2251	0.0155-0.0249	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	3,2017	2.7426-3.6588	Presente estudo	nº frondes
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Lemna minor</i>	7d	Rendimento	7,456	6-9	Presente estudo	peso seco
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	3,606	2.9240-4.2874	Presente estudo	nº frondes
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Lemna gibba</i>	7d	Rendimento	5,229	1-9	Presente estudo	peso seco
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Daphnia magna</i>	24h+4h	Inibição Alimentar - pós exposição	8,941	4-14	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Corbicula fluminea</i>	2h	Inibição Alimentar	1,716	1-2	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Absorção do saco vitelino(%)	1,633×10 <sup>4</sup>	7017-25642	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Defeito na cauda (%)	1,811×10 <sup>4</sup>	16253-19966	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Problema de equilíbrio (%)	9188	6816-11561	Presente estudo	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	<i>Danio rerio</i>	5d	Posição lateral (%)	1,134×10 <sup>4</sup>	10433-12242	Presente estudo	

## Capítulo III. Potencial de líquidos iônicos para causar *stress* e dano oxidativo em *Daphnia magna*

### Resumo

Os Líquidos Iônicos (LIs) são cada vez mais compostos de interesse, devido às suas características e funcionalidades. Apesar de serem considerados solventes “verdes” ainda não se conhecem bem os seus efeitos a nível celular, embora se tenda a assumir que o mecanismo de toxicidade dos LIs esteja ligado primariamente a danos nas membranas celulares. Neste contexto, este trabalho desenvolveu-se sob três objetivos essenciais: (i) avaliar as respostas de atividade à exposição de *Daphnia magna* a LIs; (ii) verificar se os LIs promovem dano membranar de natureza oxidativa; (iii) confirmar se as regras heurísticas que relacionam a estrutura dos LIs com a sua ecotoxicidade se aplicam em parâmetros sub-celulares. Os biomarcadores selecionados para este trabalho foram as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) que denotam dano oxidativo membranar, bem como a atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST), com o intuito de entender como varia a produção de ROS em dáfias expostas e a consequente defesa antioxidante. O nível das TBARS, tal como a atividade da enzima GST, não foram afetados pela exposição aos LIs, pelo que não é possível inferir acerca do efeito destes LIs em termos de dano oxidativo membranar e de atividade antioxidante. No entanto, os dados da GR permitem validar a regra heurística do aumento da cadeia alquílica do catião que se traduz num aumento significativo do *stress* oxidativo medido por esta enzima (GR) quando se comparam os efeitos da exposição a [C<sub>2</sub>mim]Cl com os da exposição a [C<sub>12</sub>mim]Cl. O efeito muito acentuado do [C<sub>12</sub>mim]Cl ao nível de *stress* oxidativo levanta preocupações acerca dos potenciais efeitos deste LI numa exposição mais longa em organismos aquáticos.

**Palavras-chave** | *Daphnia magna*; espécies reativas de oxigénio; substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico; biomarcadores enzimáticos; biomarcadores de dano oxidativo; regras heurísticas.

### III.1. Introdução

Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais que se apresentam no estado líquido a temperaturas inferiores a 100°C, sendo alguns líquidos inclusive à temperatura ambiente (Kragl *et al.* 2002; Wasserscheid e Welton 2007). Estes sais são compostos por aniões de pequenas dimensões e catiões de maiores ou menores dimensões, orgânicos ou inorgânicos. Os LIs apresentam características únicas, tais como pressão de vapor insignificante, boa solubilidade para muitos materiais orgânicos e inorgânicos e, teoricamente, baixa toxicidade (Freire *et al.* 2007; Ventura *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015), razão pela qual são frequentemente referidos como “solventes verdes”. Por este motivo, estes compostos têm recebido grande atenção e interesse ao nível da investigação científica, sendo alguns já utilizados em aplicações industriais, como por exemplo no ramo da Engenharia Química (Zhao *et al.* 2011). Estes compostos podem, no entanto, atingir o meio aquático, podendo causar efeitos adversos para a biota aquática. Apesar de já existirem estudos acerca da toxicidade de LIs para organismos aquáticos (*e.g.* Bernot *et al.* 2005; Couling *et al.* 2006; Samorì *et al.* 2007; Cho *et al.* 2008a, b; Kulacki e Lamberti 2008; Yu *et al.* 2009; Costello *et al.* 2009; Du *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013; Ventura *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015), pouco se sabe acerca do seu mecanismo de ação/toxicidade.

De um modo geral, a toxicidade dos LIs tem sido atribuída a alterações na estrutura e permeabilidade das membranas e paredes celulares (Shao *et al.* 2018), tal como sugerido para várias espécies aquáticas (*Aliivibrio fischeri*, *Lemna minor* e *Scenedesmus vacuolatus*) (Stolte *et al.* 2007). A alteração da fluidez e permeabilidade da membrana celular após exposição a LIs deve-se à oxidação promovida por espécies reativas de oxigénio (ROS) que a defesa antioxidativa das células não consegue eliminar (Kumar *et al.* 2011; Shao *et al.* 2018). Estudos anteriores mostraram que os LIs podem conduzir a uma produção exacerbada de ROS, o que se traduz na alteração da atividade de várias enzimas antioxidantes<sup>14</sup> e de destoxificação/biotransformação<sup>15</sup>, quer em organismos de solo (Shao *et al.* 2018), quer em organismos aquáticos (Kumar *et al.* 2011, Du *et al.* 2012). Por exemplo, a exposição do peixe *D. rerio* a 1-decil-3-metilimidazólio ([C<sub>10</sub>mim]Br) provocou a inibição da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), o que revela danos no sistema de defesa antioxidante do peixe (Du *et al.* 2012).

---

<sup>14</sup> Alguns exemplos de enzimas antioxidantes são: SOD, CAT; glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR).

Além dos peixes (Du *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013), já foram observados efeitos dos LIs em termos de *stress* oxidativo, noutros organismos aquáticos, tais como algas verdes (Liu *et al.* 2018) e invertebrados (Yu *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2016). O potencial dos LIs para causar dano oxidativo foi também já efetivamente sinalizado, por exemplo após exposição da macroalga marinha *Ulva lactuca*, em minhocas terrestres, em *Daphnia* e em planárias (Yu *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2011; Liu *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016; Shao *et al.* 2018). O dano oxidativo pode dever-se à peroxidação lipídica e resulta do facto dos organismos não conseguirem “controlar” o excesso de ROS (Barata *et al.* 2005). Os peróxidos lipídicos produzem e decompõem-se numa variedade de substâncias, sendo a mais importante o malondialdeído (MDA) (Leibovitz e Siegel 1980), o qual é utilizado como biomarcador sensível para sinalizar dano oxidativo (Yu *et al.* 2009). A reação do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é um dos princípios mais utilizados para monitorizar dano oxidativo (Liu *et al.* 1997), através do ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) (Oakes e Van Der Kraak 2003).

Neste trabalho foi utilizada a espécie *Daphnia magna* como espécie modelo representativa dos ecossistemas de água doce. Esta espécie de cladóceros é amplamente utilizada como organismo modelo em ecologia aquática, biologia evolutiva e ecotoxicologia. Os dafnídeos são organismos particularmente adequados como organismos experimentais, pois são fáceis de manter em laboratório, têm ciclos de vida curtos e produtivos e são partenogénicos cíclicos (eliminando a variância genotípica dentro e entre experiências). A relevância dos cladóceros como organismos modelo reside também no papel-chave ecológico desempenhado por estas populações na dinâmica da cadeia alimentar da zona pelágica (Benzie 2005). Estes organismos constituem um importante recurso alimentar para muitas espécies de peixes e são os principais herbívoros em ecossistemas lênticos, assumindo, portanto, um papel central nas interações tróficas que ocorrem nos ecossistemas de água doce (Tessier *et al.* 2000).

A variação da toxicidade, quando avaliada ao nível individual, segue algumas regras heurísticas relativas à relação entre a estrutura e toxicidade (efeito do anião, efeito do catião e efeito do aumento da cadeia alquílica do catião). Estas regras foram validadas no **Capítulo II**, considerando uma abordagem integradora da comunidade aquática. No

---

<sup>15</sup> Um exemplo de enzimas de destoxificação/biotransformação é a glutathione S-transferase (GST).

entanto, os trabalhos existentes não permitem avaliar se as regras heurísticas confirmadas no capítulo anterior são aplicáveis a parâmetros sub-celulares.

Assim, o presente trabalho desenvolveu-se sob três objetivos principais: (i) avaliar o potencial de vários LIs (dois LIs à base do catião colina e dois LIs derivados da família dos imidazólios) como indutores de *stress* oxidativo em *Daphnia magna*; (ii) avaliar até que ponto o *stress* oxidativo potencialmente induzido pela exposição aos LIs se traduz efetivamente em dano oxidativo membranar e (iii) confirmar a validade das regras heurísticas que relacionam a estrutura-ecotoxicidade com LIs se se aplicam ou não ao nível sub-celular.

A atividade antioxidante foi avaliada através da atividade das enzimas GR e GST, ambas da primeira linha de defesa antioxidante, sendo GR uma enzima antioxidante e a GST uma enzima de destoxificação. O dano oxidativo membranar, foi avaliado através do ensaio de TBARS. Uma vez que o número de estudos que avaliam a sensibilidade das respostas antioxidantes de organismos aquáticos expostos a LIs é reduzido, torna-se por defeito relevante a caracterização dos efeitos de LIs de diferentes famílias a este nível, contribuindo para um melhor conhecimento do mecanismo de toxicidade via disrupção membranar que é assumido de forma generalista para todos os LIs.

## III.2. Materiais e Métodos

### III.2.1. Compostos químicos

Conforme referido no capítulo II, os LIs foram cedidos pelo Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Foram utilizados os seguintes LIs: [Chol]Cl (pureza de 98%), [Chol][DHCit] (pureza de 99,0%); [C<sub>2</sub>mim]Cl (pureza de 98,0%) e [C<sub>12</sub>mim]Cl (pureza superior a 98%). Na **Figura 2** do **Capítulo I** estão representadas as estruturas químicas dos 4 LIs que foram selecionados para este estudo.

### III.2.2. Organismo de teste e manutenção da cultura

O crustáceo de água doce *D. magna* (clone *Beak*) tem sido mantido em laboratório em culturas monoclonais há vários anos. Os dafnídeos foram cultivados em água dura ASTM (*American Society for Testing and Materials* 1980) enriquecida com vitaminas (Elendt e Bias 1990) e suplementada com um aditivo orgânico (Baird *et al.* 1989) num volume total de cerca de 800 mL. As culturas foram mantidas a uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C e um



fotoperíodo de 16 h<sup>L</sup>: 8 h<sup>E</sup>, fornecido por luzes brancas fluorescentes frias. O meio de cultura foi renovado e os organismos foram alimentados três vezes por semana, com suspensões concentradas da microalga *Raphidocelis subcapitata* ( $3 \times 10^5$  células/mL), que é cultivada ciclicamente no meio de cultura *Woods Hole MBL* (Janet *et al.* 1973).

### III.2.3. Teste de imobilização

Testes de imobilização aguda foram conduzidos de acordo com a norma OCDE 202 (OECD 2004) para aferir as concentrações a serem usadas em exposições posteriores para a avaliação das respostas de *stress* oxidativo (secção III.2.4). Utilizaram-se neonatos nascidos entre a 3<sup>a</sup> e a 5<sup>a</sup> ninhadas, com menos de 24 horas. Os testes foram realizados em tubos de ensaio de vidro contendo 25 mL de cada solução de teste. Os organismos foram expostos a uma série geométrica de concentrações de cada LI conforme apresentado na **Tabela 13**. O meio de cultura (água dura ASTM, *American Society for Testing and Materials* 1980) foi usado como tratamento de controlo negativo, bem como para preparação das soluções *stock* e para as diluições. Utilizou-se um desenho experimental estático, *i.e.*, sem renovação do meio. Para cada tratamento, incluindo controlo, foram utilizadas 4 réplicas, sendo cada réplica constituída por 5 organismos. Os organismos foram expostos durante 48 h sob as mesmas condições usadas para as culturas. O número de organismos imobilizados foi registado no final do período de exposição (OECD 2004). Os dados de imobilização para cada LI foram analisados estatisticamente (ver secção III.2.8.3) e os valores de EC<sub>20</sub><sup>16</sup> foram determinados.

---

<sup>16</sup> EC<sub>20</sub> é a concentração que se estima causar a imobilização de 20% dos organismos expostos.

**Tabela 13** – Gama de concentrações de cada composto usada no teste agudo de imobilização com *D. magna* (solução stock = 1500 mg/L para [Chol]Cl; solução stock = 1000 mg/L para [Chol][DHCit]; solução stock = 1000 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl; solução stock = 10,00 mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl).

Tratamento	[Chol]Cl	[Chol][DHCit]	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
[CTR]	0	0	0	0
1	400,0	250,0	60,00	1,000×10 <sup>-3</sup>
2	480,0	325,0	78,00	1,500×10 <sup>-3</sup>
3	576,0	422,5	101,4	2,250×10 <sup>-3</sup>
4	691,2	549,3	131,8	3,375×10 <sup>-3</sup>
5	829,4	714,0	171,4	5,063×10 <sup>-3</sup>
6	995,3	928,2	222,8	7,594×10 <sup>-3</sup>
7	1194	1207	289,6	1,139×10 <sup>-2</sup>

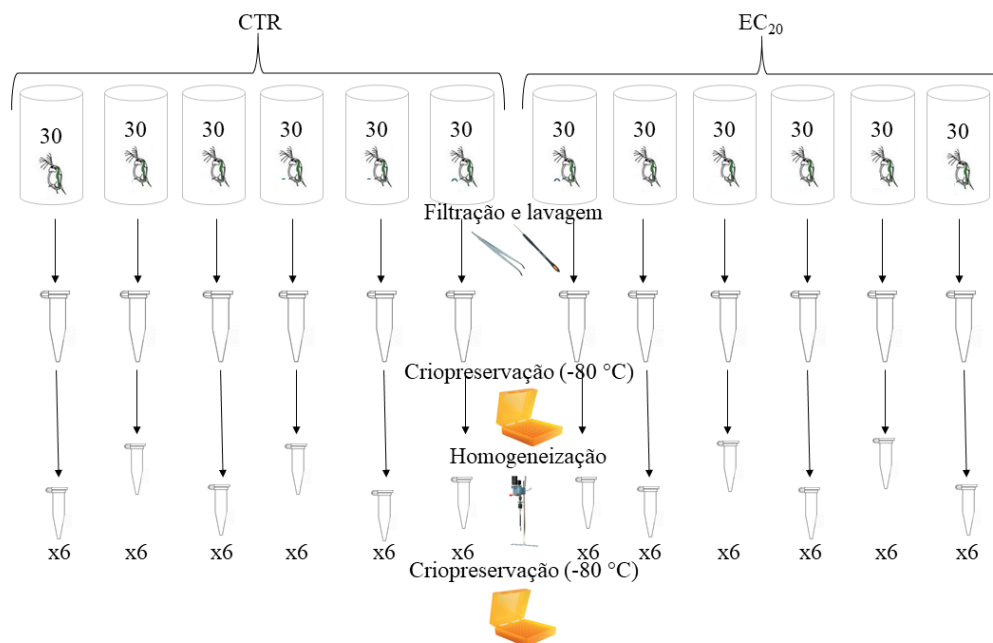
#### III.2.4. Exposição para análise das respostas de stress oxidativo

Neonatos de *D. magna* (< 24 h; 3<sup>a</sup> – 5<sup>a</sup> ninhada) foram expostos à concentração correspondente ao EC<sub>20</sub> para cada LI: 352,2 mg/L para [Chol]Cl; 307,7 mg/L para [Chol][DHCit]; 126,3 mg/L para [C<sub>2</sub>mim]Cl e 2,270×10<sup>-3</sup> mg/L para [C<sub>12</sub>mim]Cl (detalhes podem ser consultados na secção de resultados, **Tabela 14**).

**Tabela 14** – Valores de efeito de imobilização (EC<sub>50</sub>, EC<sub>20</sub> e EC<sub>10</sub>, em mg/mL) em *D. magna* exposta aos LIs durante 48 h; os limites de confiança associados a cada valor estimado são indicados entre parêntesis (*lower confidence limit (lower - CL)* – *upper confidence limit (upper CL)*).

LIs	EC <sub>10</sub> (mg/L)	EC <sub>20</sub> (mg/L)	EC <sub>50</sub> (mg/L)
[Chol]Cl	278,4 (166,6 – 357,9)	352,2 (239,4 – 428,5)	552,1 (463,5 – 625,1)
[Chol][DHCit]	273,9 (228,1 – 306,0)	307,7 (267,1 – 338,3)	384,5 (351,1 – 421,8)
[C <sub>2</sub> mim]Cl	112,4(94,09 – 125,4)	126,3 (110,1 – 138,8)	158,1 (144,6 – 173,2)
[C <sub>12</sub> mim]Cl	1,846×10 <sup>-3</sup> (1,368×10 <sup>-3</sup> – 2,232×10 <sup>-3</sup> )	2,270×10 <sup>-3</sup> (1,794×10 <sup>-3</sup> – 2,668×10 <sup>-3</sup> )	3,374×10 <sup>-3</sup> (2,899×10 <sup>-3</sup> – 3,905×10 <sup>-3</sup> )

A **Figura 12** apresenta um diagrama esquemático do procedimento de exposição e tratamento das amostras após exposição.



**Figura 12** – Ilustração do desenho experimental utilizado para exposição dos organismos a cada LI e da posterior criopreservação das amostras e homogeneização efetuada antes dos ensaios bioquímicos.

A exposição foi realizada em frascos de vidro contendo 100 mL de solução de teste. O meio de cultura (água dura ASTM) foi usado como tratamento de controlo negativo (**Figura 12**), bem como meio de diluição. Utilizou-se um desenho experimental estático, com 180 animais distribuídos aleatoriamente em seis réplicas (trinta organismos por frasco) e respetivos controlos. No caso da exposição ao LI, foi incluída uma réplica extra, para compensar os organismos que eventualmente estivessem imobilizados no final da exposição. Os organismos foram expostos por 48 h sob as mesmas condições usadas para as culturas. No entanto, após as primeiras 24 h os dafnídeos imobilizados foram contabilizados e removidos. No final da exposição, o número de dafnídeos imobilizados foi novamente registado e foram retirados os organismos não imobilizados, os quais foram lavados com água dura ASTM. De seguida, os organismos lavados foram rapidamente transferidos para *eppendorfs* (30 organismos em cada *eppendorf*) com a ajuda de um pincel e uma pinça, e foram criopreservados a -80 °C até ao processamento das amostras.

### III.2.5. Homogeneização

As amostras foram retiradas da arca -80 °C e colocadas numa caixa com gelo, para descongelarem lentamente, mantendo a temperatura adequada<sup>17</sup> para não haver degradação das enzimas durante a manipulação pré-ensaio. Para homogeneização das amostras utilizou-se 1 mL de tampão de homogeneização, que neste caso foi o tampão fosfato 500 mM, pH=7 com *Triton* X-100 0,1%. As amostras foram homogeneizadas num homogeneizador rotativo (Ystral® D-79282, Ballrechten-Dottingen), durante 5-10 s (todo este processo é feito sempre em gelo). Após a homogeneização de cada réplica, o homogeneizado foi dividido em cinco partes (5 novos tubos eppendorf com 100 µL da amostra homogeneizada), sendo cada parte utilizada num dos ensaios bioquímicos descritos nas secções seguintes (quantificação de proteína, TBARS, GR e GST). Todas as alíquotas foram recolocadas na arca -80 °C, para conservação até posterior utilização. Antes de cada ensaio bioquímico, as respetivas amostras foram descongeladas lentamente (em gelo).

### III.2.6. Quantificação da proteína

O princípio do método de quantificação de proteína envolve a ligação de um corante, neste caso o reagente de *Bradford* (*Biorad*®)<sup>18</sup>, à proteína total, dando origem a um complexo corado e estável, passível de ser quantificado a 595 nm. É necessário proceder à preparação de padrões (P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>), tendo-se utilizado  $\gamma$ -globulina bovina para o efeito com concentração em *stock* de 1 mg/mL (**Tabela 15**) de forma a definir uma curva de calibração para posterior quantificação da proteína presente nas amostras testadas.

**Tabela 15** – Volumes usados para a preparação de cada padrão.

	Volume de água ultrapura (µL)	Volume de <i>Biorad</i> ® diluído (µL)	Volume de padrão (µL)
<b>P0</b>	10	250	-
<b>P1</b>	8	250	2
<b>P2</b>	5	250	5
<b>P3</b>	0	250	10

<sup>17</sup> Garantiu-se que a temperatura a que as amostras se encontravam era inferior a 4 °C.

<sup>18</sup> Diluição de 1:4, com 1 parte de reagente de *Bradford* (*Biorad*®) concentrado e 4 partes - de água ultrapura.

Para a determinação da proteína nas amostras foi adicionado 250 µL de Biorad® diluído (proporção 1:4) a 10 µL de amostra, em microplaca de 96 poços. Seguiu-se a leitura no espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, China) a 595 nm.

### III.2.7. Quantificação de peroxidação lipídica – ensaio de TBARS

São necessários dois reagentes para a realização deste ensaio: a solução de ácido tricloroacético 10% (A) e a solução de ácido tiobarbitúrico 1% (B). O volume de amostra utilizado no ensaio com TBARS foi de 100 µL para um total de 500 µL de reação. Neste ensaio, o malondialdeído ( $\epsilon = 1,560 \times 10^6$  M/cm) que possa existir nas amostras resultante da decomposição dos peróxidos lipídicos reage com o TBA adicionado à reação, produzindo a cor que se deteta espectrofotometricamente no final do ensaio.

As amostras descongeladas são centrifugadas a 15000 G durante 10 min a 4 °C, após o que a 100 µL de amostra centrifugada ou o branco (tampão) se adiciona 200 µL de solução A e procede-se a uma segunda centrifugação a 10000 G (6000 rpm) durante 1-3 min. A 250 µL de sobrenadante/branco adiciona-se 250 µL de solução B. Posteriormente, colocam-se os tubos *ependorf* em banho fervente durante 10 min. Após arrefecimento das amostras, procede-se à leitura de absorvâncias (espectrofotômetro, Thermo Electron Corporation, China) a 530 nm, com 5 replicados.

### III.2.8. Biomarcadores enzimáticos

#### III.2.8.1. Quantificação da atividade da enzima GR

Este método quantifica a atividade da enzima GR através da monitorização a 340 nm da oxidação do NADPH ( $\epsilon = 6,2$  mM/cm) (Carlberg e Mannervik 1985). A atividade enzimática é expressa em micromoles de NADPH oxidadas por minuto e por mg de proteína.

Para a execução deste ensaio são requeridos três reagentes essenciais: tampão fosfato 200 mM, com EDTA 2 mM, a pH = 7,0 (solução 1); solução de GSSH 10 mM em H<sub>2</sub>O desionizada (solução 2); NADPH 1 mM em TRIS.HCl 10 mM, a pH = 7,0 (solução 3). Para preparar a solução 1 são necessárias 2 soluções intermédias, uma básica e outra ácida. Prepararam-se 500 mL da solução básica e 250 mL da solução ácida, adicionando-se a solução ácida à básica até atingir pH 7,0. A solução 2 foi preparada em gelo pois a GSSH

começa a degradar-se a 4 °C. A solução 3 prepara-se por adição de TRIS.HCl 10 mM a NADPH. Esta solução deve ser mantida protegida da luz pois o NADPH é fotossensível.

Em cada poço de microplaca de 96 poços estabelecem-se as soluções de reação, adicionando-se 100 µL de tampão fosfato pré-aquecido a 25 °C, 30 µL de GSSH, 90 µL de água destilada pré-aquecida a 25 °C e 50 µL de amostra. A reação é iniciada com a adição de 30 µL de NADPH.

É recomendável que a primeira coluna da microplaca seja deixada completamente vazia, de modo a quantificar a absorvância decorrente do plástico (branco do plástico). A segunda coluna da microplaca deverá ser preenchida como indicado anteriormente, substituindo o volume referente à amostra por tampão fosfato. A absorvância a 340 nm foi monitorizada continuamente durante 5 min, em intervalos de 20 s (Carlberg e Mannervik 1985), em leitor de microplacas (BioTek Instruments, U.S.A). Cada amostra é ensaiada em quadruplicado.

### **III.2.8.2. GST**

As transferases da glutathione são um grupo de enzimas relacionadas que catalisam a conjugação da glutathione com vários compostos com centros eletrofílicos. As GST catalisam a reação de conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB -  $\epsilon = 9,6$  mM/cm) com a GSH, formando-se um tioéter que pode ser monitorizado pelo aumento de absorvância a 340 nm, sendo este o princípio do método utilizado.

Para a quantificação da atividade destas enzimas são necessárias várias soluções: tampão fosfato 0,1 M a pH 6,5; solução de GSH 10 mM; solução de CDNB 60 mM, as quais são usadas para preparar a solução de reação.

O tampão fosfato 0,1 M a pH 6,5 é preparado a partir de duas soluções intermédias: solução *a* ( $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  em água, com uma concentração de 0,01741 g/mL num total de 500 mL) e a solução *b* ( $KH_2PO_4$  em 500 mL de água e com uma concentração de 0,01360 g/mL). Posteriormente adicionou-se a solução *b* à solução *a* até a solução final atingir o pH pretendido. A solução de GSH 10 mM foi preparada em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M a pH = 6,5 e a de CDNB 60 mM em 1 mL de etanol. É de notar que as soluções de GSH 10 mM e CDNB 60 mM são fotodegradáveis e como tal devem ser conservadas no escuro até à sua utilização.

A solução de reação é preparada só antes de ser utilizada, em recipiente dedicado. Tendo em conta o volume necessário para o ensaio, a solução preparou-se adicionando 4,95 mL tampão 0,1 M a pH 6,5, 900  $\mu$ L de solução GSH<sup>19</sup> 10 mM e 150  $\mu$ L solução CDNB 60 mM.

Adicionou-se a cada poço de microplaca de 96 poços 10  $\mu$ L de amostra e 200  $\mu$ L de solução de reação. Imediatamente após a adição da solução de reação iniciou-se a leitura da absorvância (leitor de microplacas BioTek Instruments, U.S.A) a 340 nm, procedendo-se a repetidas leituras a cada 20 s até completar 5 min.

Também neste caso, a primeira coluna da microplaca deverá ser deixada completamente vazia, de modo a quantificar a absorvância decorrente do plástico. A segunda coluna da microplaca deverá ser preenchida tal como indicado acima, substituindo o volume referente à amostra por tampão fosfato (Hayes e Pulford 1995). Cada amostra é ensaiada em quadruplicado.

### III.2.8.3. Análise dos dados

Para estimar os EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> e EC<sub>50</sub> de imobilização a partir dos dados recolhidos nos bioensaiois com *D. magna*, foi aplicada a análise de *Probit*. Os dados EC<sub>x</sub> constituem referências ecotoxicológicas padronizadas.

Quanto à quantificação de proteína, a reta padrão, relacionando a absorvância com a concentração (mg/L) de proteína, apresentou um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) elevado de 0,9747. A quantidade de proteína de cada amostra foi utilizada para normalizar a atividade das enzimas e a concentração de TBARS encontradas em cada amostra correspondente.

Os dados relativos à atividade da GR e da GST foram tratados primeiro numa folha de cálculo de *Excel* onde, através da equação de Beer-Lambert, se calculou a decréscimo linear na concentração de substrato enzimático (lida através da variação da absorvância proporcionada pelas reações bioquímicas implementadas) em função do tempo. No caso do TBARS, utilizou-se também a lei de Beer-Lambert para determinar a concentração total de proteína em nmol.min/mg a partir das absorvâncias medidas. Posteriormente, aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) de um fator aos dados obtidos para cada biomarcador,

---

<sup>19</sup> Degrada-se muito facilmente.

de forma a testar a hipótese nula de que as médias obtidas para os diferentes LIs testados são iguais. Sempre que a hipótese nula ( $H_0$ ) foi rejeitada para o nível de significância definido de 0,05, prosseguiu-se para testes de comparações múltiplas (teste de Tukey), que permitem assinalar as diferenças entre tratamentos (controlo e diferentes LIs testados). Esta análise foi realizada no programa *Minitab*® 16.

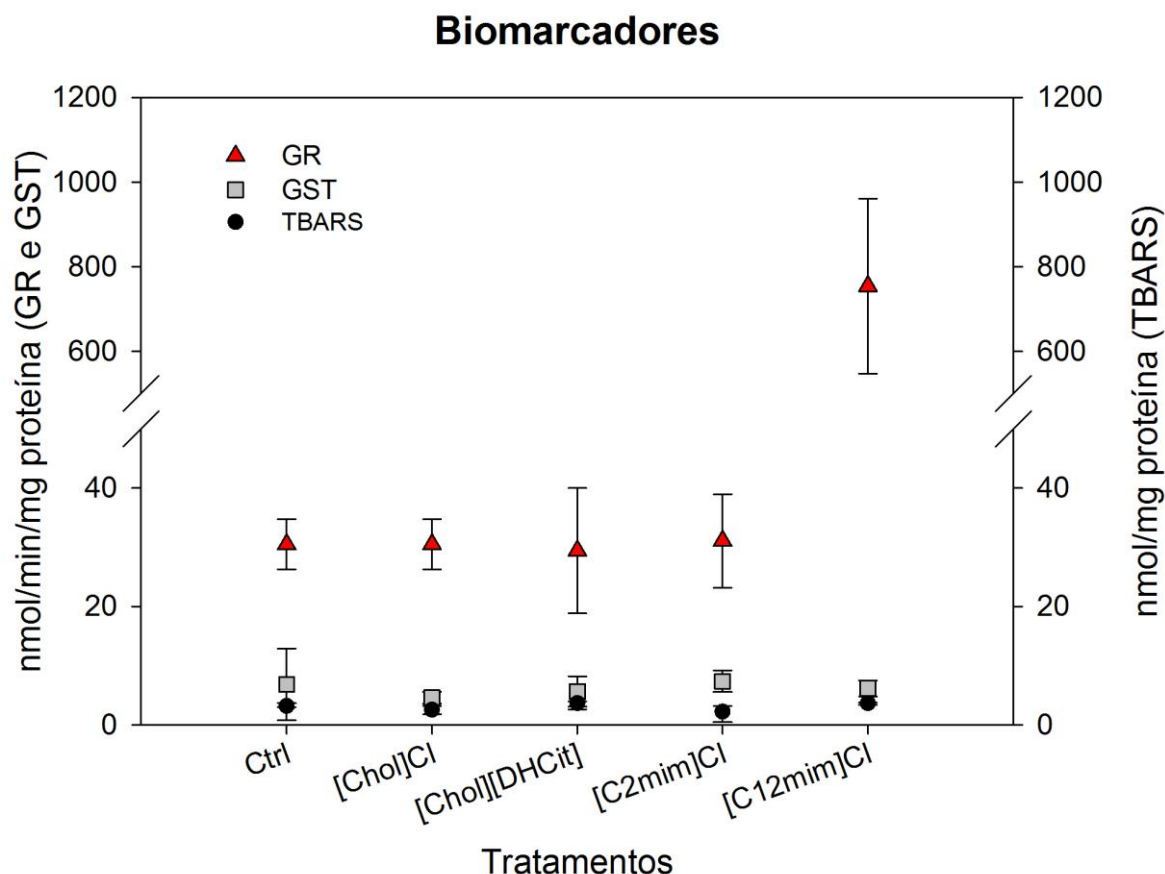
### III.3. Resultados e Discussão

Neste trabalho avaliou-se a atividade antioxidante e o dano oxidativo causado pelos quatro LIs selecionados em *D. magna*. Numa primeira fase, foi necessário determinar o valor de  $EC_{20}$  para cada LI. Numa segunda fase, os organismos foram expostos ao  $EC_{20}$  de cada LI e foi avaliada a sua resposta em termos de atividade antioxidante (medida através da atividade das enzimas GR e GST) e de dano oxidativo (medida através do ensaio de TBARS).

Os valores de efeito de imobilização de cada LI para *D. magna* são apresentados na **Tabela 14** (na **secção III.2.4.**). A toxicidade variou na seguinte ordem: [Chol]Cl < [Chol][DHCit] < [C<sub>2</sub>mim]Cl < [C<sub>12</sub>mim]Cl. Esta ordem de toxicidade era esperada considerando as regras heurísticas que se assumem para a relação entre a estrutura e a toxicidade de LIs, assim como considerando estudos anteriores (*e.g.* Matzke *et al.* 2007; Cho *et al.* 2008a; Yu *et al.* 2009; Santos *et al.* 2015). A toxicidade relativa dos LIs está provavelmente associada à variação da lipofilicidade destes compostos, tal como discutido no **Capítulo II**. Os dados de imobilização são concordantes com a variação da toxicidade dos LIs ao nível sub-letal (**Capítulo II**).

Em termos de resposta ao *stress* e dano oxidativos, na **Figura 13** são apresentados os resultados da atividade enzimática de GR e GST, bem como a quantificação das TBARS após exposição (ao  $EC_{20}$  de cada LI e ao controlo). Não foram detetadas diferenças significativas entre o controlo e os LIs para os biomarcadores GST e TBARS (**Tabela 16**). Apenas foram encontradas diferenças significativas na atividade da enzima GR, pois aquando da exposição ao [C<sub>12</sub>mim]Cl resultou um aumento bastante pronunciado da atividade desta enzima comparativamente ao controlo e aos restantes LIs (aumento de cerca de 20x).





**Figura 13** – Atividade das enzimas GR e GST e nível dos TBARS, em *D. magna* exposta a [Chol]Cl; [Chol][DHCit]; [C<sub>2</sub>mim]Cl; e [C<sub>12</sub>mim]Cl e ao controle. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value < 0,05).

**Tabela 16**– Resultados do teste ANOVA de um fator seguido do teste de TUKEY.

	Fontes de variação	gl	MS	F	P
<b>TBARS</b>	Tratamentos	4	1,577	2,69	0,093
	Erro	10	0,586		
<b>GRED</b>	Tratamentos	4	512158	53,75	<0,001
	Erro	18	9528		
<b>GST</b>	Tratamentos	4	5,63	0,64	0,639
	Erro	18	8,77		

Através do teste de imobilização podemos concluir que os LIs foram internalizados pelas dáfias e promoveram efeitos, pois observou-se imobilização em todos os tratamentos exceto o controle. Note-se que os organismos foram expostos à concentração correspondente ao EC<sub>20</sub>, pelo que se estimava cerca de 20% de imobilização dos organismos. Contudo esse efeito não se manifestou aquando dos testes com os

biomarcadores. Propomos que a resposta passe por tentar outro tipo de abordagem, ou seja, testar se estes LIs afetaram outros alvos sub-celulares. No entanto, os ensaios com os biomarcadores apresentam evidências de que apenas a enzima GR foi afetada, e apenas para o LI [C<sub>12</sub>mim]Cl. Para os restantes LIs, não houve tendências reconhecíveis graficamente nem assinaladas estatisticamente.

A falta de efeito nos TBARS não era esperada, pois estudos anteriores apresentaram efeitos significativos de vários LIs à base de imidazólio no dano oxidativo (Yu *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2011). No entanto, nestes trabalhos foi usado o MDA (a substância mais importante produzida e decomposta pelos peróxidos lipídicos) e a ascorbato peroxidase (enzima complementar ao MDA mas responsável pela 1ª linha de defesa às ROS – APx), como forma de avaliar o dano oxidativo. Assim, no sentido de confirmar se os LIs testados provocam dano oxidativo, a análise destes parâmetros (MDA e APx) seria relevante.

No que diz respeito à atividade da enzima GST, também não foram observados efeitos significativos na atividade desta enzima em organismos expostos aos vários LIs. À semelhança do descrito anteriormente, este não era um resultado esperado face às evidências de indução de *stress* oxidativo por LIs à base de imidazólios que existem na literatura, incluindo alteração da atividade da GST (Yu *et al.* 2009; Shao *et al.* 2018).

A enzima GR, sendo constituinte da segunda linha de defesa do sistema de defesa antioxidante, não está envolvida na defesa antioxidante da mesma forma que a GST. A GR merece especial atenção devido à sua importância na manutenção da homeostasia da GSH / GSSG sob condições de *stress* oxidativo (**Figura 7 do Capítulo I**). Assim, o aumento da atividade da GR pode refletir um aumento de atividade da glutathione peroxidase (GPx). Esta enzima constituinte da primeira linha de defesa antioxidante é muito importante, já que converte a GSSG produzida pela GPx em GSH, disponibilizando-a de novo para que a GPx possa continuar a processar os ROS. A GPx (Hayes e Pulford 1995) é uma importante enzima constituinte do sistema defensivo da célula contra as ROS. Esta reduz o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e os peróxidos orgânicos, oxidando as GSH e, portanto, disponibilizando GSSG, o qual serve de substrato à GR (Livingstone 2003), ou seja, a GPx depende da GR e vice-versa (Hayes e Pulford 1995). Trabalhos anteriores reportaram também efeitos significativos de vários LIs na atividade da GR (Yu *et al.* 2009; Kumar *et*

*al.* 2011), mas a confirmação da dinâmica acima sugerida merecerá atenção no futuro próximo.

Estudos anteriores mostraram realmente efeitos dos LIs na GPx, mas também na CAT e na SOD, nomeadamente por imidazólios (Yu *et al.* 2009). De facto, outra enzima a que será dada atenção no futuro próximo será a CAT, que é também um regulador principal do metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Góth *et al.* 2004), estando integrada na primeira linha de defesa de reações catalisadas por biomarcadores enzimáticos (**Figura 7 do Capítulo I**). Naturalmente, a SOD é também uma enzima de primeira linha de defesa contra as ROS (**Figura 7 do Capítulo I**) (Guasch *et al.* 2017) que vale a pena considerar. Num trabalho anterior com imidazólios também foram reportados efeitos significativos na SOD (Yu *et al.* 2009).

Os dados da GR permitem validar a regra heurística do aumento da cadeia alquílica do catião. De facto, no **Capítulo II** observámos que o aumento da cadeia alquílica do catião se traduz no aumento da toxicidade, o que concorda com os dados obtidos neste capítulo – aumento do *stress* oxidativo no [C<sub>12</sub>mim]Cl comparado com o [C<sub>2</sub>mim]Cl.

Note-se que o efeito de todos os LIs foi avaliado na concentração correspondente ao EC<sub>20</sub>, uma referência geralmente assumida como protetora para os ecossistemas. Assim, o acentuado aumento da atividade da enzima GR devida à exposição ao [C<sub>12</sub>mim]Cl, demonstra que este LI é capaz de induzir *stress* oxidativo de forma pronunciada após uma exposição curta (48 h) a uma concentração teoricamente inócua. Isto levanta preocupações acerca dos potenciais efeitos deste LI numa exposição mais longa (*e.g.* crónica).

#### III.4. Conclusão

Neste trabalho observámos que as TBARS e a atividade da GST, não sofreram variação significativa na resposta aos LIs comparativamente com o controlo. No entanto, o grande aumento da atividade da enzima GR aquando da exposição do dafnídeo ao [C<sub>12</sub>mim]Cl demonstra que este LI tem impacto negativo nos organismos. Desta forma, foi possível confirmar o potencial do LI [C<sub>12</sub>mim]Cl como indutor de *stress* oxidativo. Estes resultados apenas permitem validar a regra heurística do aumento da cadeia alquílica do catião. Contudo, existe a necessidade de alargar o estudo dos efeitos sub-celulares dos LIs a outras enzimas para explorar de uma forma mais abrangente a resposta antioxidante dos

organismos neste contexto, eventualmente possibilitando a verificação das restantes regras heurísticas.

O efeito muito acentuado do [C<sub>12</sub>mim]Cl ao nível de stress oxidativo levanta preocupações acerca dos potenciais efeitos deste LI numa exposição mais longa. Assim, recomenda-se precaução na eventual utilização industrial deste composto, de forma a prevenir efeitos adversos na biota aquática.

### III.5. Referências bibliográficas

- American Society for Testing and Materials (1980) Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E729-96 (ASTM) 1-22. doi: 10.1520/e0729-96r02
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Calow P, Soares AMVM (1989) The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia* 188–189:403–406. doi: 10.1007/BF00027806
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 140:175–186. doi: 10.1016/J.CCA.2005.01.013
- Benzie J (2005) Cladocera: the genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). Guide to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world
- Bernot RJ, Kennedy EE, Lamberti GA (2005) Effects of ionic liquids on the survival, movement and feeding behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Environ Toxicol Chem* 24:1759. doi: 10.1897/04-614R.1
- Carlberg I, Mannervik B (1985) [59] Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484–490. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13062-4
- Cho C-W, Phuong Thuy Pham T, Jeon Y-C, Yun Y-S (2008a) Influence of anions on the toxic effects of ionic liquids to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*. *Green Chem* 10:67–72. doi: 10.1039/B705520J
- Cho CW, Jeon YC, Pham TPT, Vijayaraghavan K, Yun YS (2008b) The ecotoxicity of ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:166–171. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.07.001
- Costello DM, Brown LM, Lamberti GA (2009) Acute toxic effects of ionic liquids on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) survival and feeding. *Green Chem* 11:548–553. doi: 10.1039/b822347e
- Couling DJ, Bernot RJ, Docherty KM, Dixon JK, Maginn EJ (2006) Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. *Green Chem* 8:82–90. doi: 10.1039/B511333D
- Dong M, Zhu L, Zhu S, Wang J, Wang J, Xie H, Du Z (2013) Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA

- in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Chemosphere* 91:1107–1112. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.013
- Du Z, Zhu L, Dong M, Wang J, Wang J, Xie H, Zhu S (2012) Effects of the ionic liquid [Omim]PF<sub>6</sub> on antioxidant enzyme systems, ROS and DNA damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 124–125:91–93. doi: 10.1016/J.AQUATOX.2012.08.002
- Elendt B-P, Bias W-R (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res* 24:1157–1167. doi: 10.1016/0043-1354(90)90180-E
- Freire MG, Santos LMNBF, Fernandes AM, Coutinho JAP, Marrucho IM (2007) An overview of the mutual solubilities of water-imidazolium-based ionic liquids systems. *Fluid Phase Equilib* 261:449–454. doi: 10.1016/j.fluid.2007.07.033
- Góth L, Rass P, Páy A (2004) Catalase Enzyme Mutations and their Association. *Mol Diagn*. 8:141–149.
- Guasch H, Bonet B, Bonnineau C, Barral L (2017) Microbial Biomarkers. In: *Microbial Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp 251–281
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445–520. doi: 10.3109/10409239509083491
- Janet R, Stein E, Stein J (1973) *Handbook of physiological methods: culture methods and growth measurements*. University Press, Cambridge, New York 7-252
- Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13:565–571. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00353-1
- Kulacki KJ, Lamberti GA (2008) Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. *Green Chem* 10:104–110. doi: 10.1039/B709289J
- Kumar M, Trivedi N, Reddy CRK, Jha B (2011) Toxic Effects of Imidazolium Ionic Liquids on the Green Seaweed *Ulva lactuca*: Oxidative Stress and DNA Damage. *Chem Res Toxicol* 24:1882–1890. doi: 10.1021/tx200228c
- Leibovitz BE, Siegel B V. (1980) Aspects of Free Radical Reactions in Biological Systems: Aging. *J Gerontol* 35:45–56. doi: 10.1093/geronj/35.1.45

- Liu D, Liu H, Wang S, Chen J, Xia Y (2018) The toxicity of ionic liquid 1-decylpyridinium bromide to the algae *Scenedesmus obliquus*: Growth inhibition, phototoxicity, and oxidative stress. *Sci Total Environ* 622–623:1572–1580. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2017.10.021
- Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN (1997) Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Anal Biochem* 245:161–166. doi: 10.1006/ABIO.1996.9990
- Liu X, Zhang S, Wang J, Wang J (2016) Biochemical responses and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) induced by ionic liquid [omim] PF 6. 6836–6844. doi: 10.1007/s11356-015-5827-2
- Livingstone D (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Méd Vét* 154:427–430
- Matzke M, Stolte S, Thiele K, Juffernholz T, Arning J, Ranke J, Welz-Biermann U, Jastorff B (2007) The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chem* 9:1198–1207. doi: 10.1039/b705795d
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63:447–463. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00204-7
- OECD (2004) Teste No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. 1–12. doi: 00000001/00000002/9722701e
- Samorì C, Pasteris A, Galletti P, Tagliavini E (2007) Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 26:2379–2382. doi: 10.1897/07-066R2.1
- Santos JI, Gonçalves AMM, Pereira JL, Figueiredo BFHT, e Silva FA, Coutinho JAP, Ventura SPM, Gonçalves F (2015) Environmental safety of cholinium-based ionic liquids: assessing structure–ecotoxicity relationships. *Green Chem* 17:4657–4668. doi: 10.1039/C5GC01129A
- Shao Y, Wang J, Du Z, Li B, Zhu L, Wang J (2018) Chemosphere Toxicity of 1-alkyl-3-methyl imidazolium nitrate ionic liquids to earthworms: The effects of carbon chains of different lengths. *Chemosphere* 206:302–309. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.114

- Stolte S, Matzke M, Arning J, Bösch A, Pitner W-R, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2007) Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chem* 9:1170-1179. doi: 10.1039/b711119c
- Tessier AJ, Leibold MA, Tsao J (2000) A fundamental trade-off in resource exploitation by *Daphnia* and consequences to plankton communities. *Ecology* 81:826–841. doi: 10.1890/0012-9658(2000)081[0826:AFTOIR]2.0.CO;2
- Ventura SPM, e Silva FA, Gonçalves AMM, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP (2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 102:48–54. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.003
- Wasserscheid P, Welton T (Thomas) (2007) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH 747-769
- Yu M, Wang SH, Luo YR, Han, YW, Li XY, Zhang BJ, Wang JJ (2009) Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1798–1804. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.05.002
- Zhang H-C, Shi C-Y, Sun L-Q, Wang F, Chen GW (2016) Toxic effects of ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant defense system of freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Toxicol Ind Health* 32:1675–1683. doi: 10.1177/0748233715573692
- Zhao H, Baker GA, Holmes S (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org Biomol Chem* 9:1908. doi: 10.1039/c0ob01011a



## Capítulo IV. Considerações Finais

### IV.1. Conclusões finais

Os Líquidos Iônicos (LIs) apresentam propriedades específicas, que lhes conferem vantagens face a outros compostos, como é o caso nomeadamente dos solventes tradicionais. Uma das características que se atribui aos LIs é a baixa toxicidade, o que contribui para a sua frequente designação como “solventes verdes”. Os LIs apresentam também a particularidade de serem “designer solvents”, ou seja, é possível modificar o anião e/ou o catião (*e.g.* em termos de grupos funcionais e/ou cadeia alquílica) de modo a obter as propriedades físico-químicas pretendidas para uma determinada aplicação. No entanto, esta alteração traduz-se também na alteração da sua toxicidade. Assim, é possível criar uma grande variedade de LIs, o que torna moroso e dispendioso o processo de avaliação da toxicidade de todas as estruturas iónicas desenvolvidas conforme é requerido pela regulamentação de proteção ambiental. Logo, é útil estudar a aplicação de regras heurísticas que relacionem variações estruturais nos LIs com a sua toxicidade.

Estudos anteriores mostraram que a toxicidade dos LIs varia com o anião, o catião e o comprimento da cadeia alquílica do catião. No entanto, a toxicidade dos LIs não depende só das propriedades do LI, mas também do organismo modelo usado, ou seja, da sensibilidade de cada espécie. Por este motivo, é relevante estabelecer relações entre a estrutura dos LIs e a sua ecotoxicidade, mas integrando a sensibilidade de várias espécies representativas dos ecossistemas que possam eventualmente ser contaminados com estes compostos (em princípio, os ecossistemas aquáticos serão alvos principais). É também relevante complementar a curta base de dados que existe atualmente na literatura sobre efeitos sub-celulares de LIs e, em particular validar as regras heurísticas enunciadas a este nível de organização biológica.

Dada a vasta gama de aplicações dos LIs, estes são cada vez mais utilizados em aplicações industriais. Logo, estes compostos começarão a estar cada vez mais presentes no ambiente, em particular no ecossistema aquático, o que pode causar efeitos adversos na biota aquática. Devido a esta problemática atual torna-se relevante desenvolver os estudos como os que são apresentados nesta Dissertação.

Numa primeira fase, avaliámos a toxicidade de vários LIs para as comunidades aquáticas, usando a abordagem das SSDs (distribuição de sensibilidade de espécies).

Esta abordagem, por incluir não apenas uma, mas várias espécies representativas das comunidades aquáticas, reflete a toxicidade para a mesma sendo, portanto, mais relevante do ponto de vista ambiental (Brix *et al.* 2001). A utilização desta abordagem permitiu validar as regras heurísticas associadas ao efeito da variação do anião, do catião e do aumento da cadeia alquílica do catião, na toxicidade dos LIs. A toxicidade dos LIs variou de acordo com a seguinte ordem:  $[\text{Chol}]\text{Cl} \approx [\text{Chol}][\text{DHCit}] \leq [\text{C}_2\text{mim}]\text{Cl} < [\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ . O facto dos valores de  $\text{HC}_5$  e  $\text{HC}_{50}$  para o  $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$  serem baixos (0,002421 mg/L e 9,507 mg/L, respetivamente), levanta preocupações acerca dos efeitos deste LI para as comunidades aquáticas, o que poderá ser válido para outros LIs com uma cadeia alquílica do catião longa. Como observação final, vale a pena sugerir a continuação deste tipo de estudos integrativos para melhor caracterizar o potencial de risco ambiental das famílias de LIs estudados neste trabalho. Esta abordagem integradora deverá ainda ser estendida a LIs de outras famílias, *i.e.*, baseados noutros catiões e aniões, para facilitar a generalização de tendências de estrutura-ecotoxicidade em LIs.

Numa segunda fase, pretendeu-se avaliar o dano e *stress* oxidativo causado pelos LIs e verificar se as regras heurísticas se mantêm ao nível sub-celular. Foram avaliados os seguintes biomarcadores: TBARS (substâncias reativas ao ácido 2- tiobarbitúrico), GR (glutathione redutase) e GST (glutathione S-transferase), usando como organismo modelo a espécie *D. magna*. Não foram encontradas evidências de dano oxidativo membranar, mas observou-se *stress* oxidativo provocado pelo  $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ . Assim, conclui-se que a regra heurística do efeito do aumento da cadeia alquílica do catião se mantém a nível sub-celular – uma mais longa cadeia alquílica do catião implica maior *stress* oxidativo, o que corrobora os resultados observados ao nível do organismo (e da comunidade). Para ambos os níveis de organização observou-se que o  $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$  apresenta uma elevada toxicidade. A sua elevada toxicidade representa uma preocupação no caso deste LI atingir o meio aquático. Esta preocupação poderá ser estendida a outros LIs com uma cadeia alquílica do catião longa. Dada a falta de efeitos significativos nos biomarcadores TBARS e GST, e no sentido de avaliar se o mecanismo de ação dos LIs inclui efetivamente disrupção membranar de natureza oxidativa, será necessário avaliar a atividade de outros biomarcadores de *stress* oxidativo face à exposição aos LIs, obtendo, assim, resultados mais robustos para inferir acerca deste tipo de efeitos dos LIs a nível sub-celular.

Os LIs são considerados os solventes do futuro (Austen Angell *et al.* 2012). Os métodos aqui apresentados contribuem para uma definição de LIs menos nocivos para o ambiente, uma informação que pode ser utilizada em fases precoces de conceptualização e/ou desenvolvimento destes compostos e/ou processos. Será, no entanto, necessário confirmar sempre a toxicidade dos LIs selecionados antes de iniciar a sua comercialização, respeitando a legislação europeia em vigor, nomeadamente a diretiva REACH. Além de ser necessário desenvolver estudos para uma melhor previsão da toxicidade relativa de um determinado LI, a aplicação dos LIs a nível industrial terá ainda de ultrapassar outros obstáculos. Um dos aspetos mais importantes será encontrar processos eficientes para tratar as quantidades de LIs que poderão estar em breve presentes nas águas residuais urbanas e industriais. É necessário realizar trabalhos continuados e melhorados para reduzir a toxicidade dos efluentes contaminados por LIs e preparar o futuro para generalizar o seu uso industrial.

Uma das aplicações industriais mais promissoras para os LIs será, eventualmente, a produção de energia limpa e produtos de base biológica devido às suas excelentes propriedades físico-químicas e excelente desempenho na dissolução e separação da celulose. De facto, devido à escassez mundial de energia e à poluição ambiental, é recomendado fazer uso total da biomassa celulósica no futuro. O uso de LIs tem proporcionado uma nova plataforma para a utilização “verde” da celulose, o que poderá contribuir para o avanço na produção de produtos químicos e reduzir a dependência de matérias-primas não-renováveis à base de petróleo (Earle e Seddon 2000; Cao *et al.* 2016). Outra das aplicações dos LIs com maior potencial de desenvolvimento futuro será a extração e separação de compostos bioativos das mais diversas origens. Devido às circunstâncias atuais, o desenvolvimento de processos de extração e separação economicamente viáveis e mais sustentáveis são o passo crítico para a recuperação e comercialização de produtos bioativos novos e de baixo custo para vários setores (*e.g.* nutracêuticos, cosméticos e farmacêuticos), o que permitirá o seu amplo uso num futuro próximo.

Vivemos numa era em que as necessidades da população humana são crescentes, e em que os LIs poderiam desempenhar um papel notável como solventes e materiais alternativos (Ventura *et al.* 2015). De qualquer modo, o conhecimento dos LIs avançou significativamente durante os últimos anos, e o crescente interesse nestes como solventes não deve cessar no futuro próximo (Cao *et al.* 2017).

## **IV.2. Referências bibliográficas**

- Austen Angell C, Ansari Y, Zhao Z (2012) Ionic Liquids: Past, present and future. *Faraday Discuss* 154:9–27. doi: 10.1039/C1FD00112D
- Brix K V., DeForest DK, Adams WJ (2001) Assessing acute and chronic copper risks to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups. *Environ Toxicol Chem* 20:1846–1856. doi: 10.1002/etc.5620200831
- Cao Y, Niu W, Guo J, Xian M, Liu H (2016) Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. *Sci Rep* 5:18149–18156. doi: 10.1038/srep18149
- Cao Y, Zhang R, Cheng T, Guo J, Xian M, Liu H (2017) Imidazolium-based ionic liquids for cellulose pretreatment: recent progresses and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:521–532. doi: 10.1007/s00253-016-8057-8
- Earle MJ, Seddon KR (2000) Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl Chem* 72:1391–1398. doi: 10.1351/pac200072071391
- Ventura SPM, Silva FA, Quental M V, Mondal D, Freire MG, Coutinho AP (2015) Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem Rev.* 117 (10), pp 6984 – 7052. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00550